

# Effekt av små røntgendoser på humane celler

-

Individuelle celleresponser målt ved bruk av  
”time-lapse” cinematografi og koloni-metoden

Siri Fenne



Oppgave for graden Master of Science

Fysisk Institutt  
Universitet i Oslo

Februar 2008



# Forord

Arbeidet med denne masteroppgaven er utført på gruppa for Biofysikk og Medisinsk Fysikk ved Fysisk Institutt, Universitetet i Oslo.

Jeg vil først og fremst takke mine veiledere, Nina F.J. Edin og Erik O. Pettersen for gode faglige tilbakemeldinger og innspill underveis i oppgaven. Det har virkelig vært inspirerende å skrive oppgave under dere! En ekstra takk til Nina for all opplæring på cellelaben, samt teknisk assistanse i forbindelse med forsøk og humørsykt filmutstyr. I tillegg ønsker jeg å takke deg for godt selskap og for ditt smittende gode humør i en ellers så hektisk hverdag.

Jeg ønsker også å rette en takk til Joe A. Sandvik for assistanse på cellelaben og teknisk hjelp med filmutstyret, samt instrumentverkstedet ved Fysisk institutt som har laget kilene til mikroskopet.

Takk til alle studenter og ansatte på gruppa som har gjort Biofysikk til et trivelig sted å studere.

Til slutt vil jeg takke familie, venner og kjæreste for all oppmuntring og støtte.

Siri Fenne



# Innhold

<b>Sammendrag.....</b>	<b>1</b>
<b>Summary.....</b>	<b>3</b>
<b>Forkortelser og definisjoner .....</b>	<b>5</b>
 <b>1 Innledning.....</b>	 <b>7</b>
 <b>2 Teori .....</b>	 <b>10</b>
<b>2.1 Cellebiologi .....</b>	<b>10</b>
2.1.1 Cellesyklus.....	10
2.1.2 Regulering av cellesyklus .....	10
2.1.3 Cellens morfologi.....	11
2.1.4 Cellebevegelse .....	13
<b>2.2 Strålingsfysikk.....</b>	<b>16</b>
2.2.1 Ioniserende stråling.....	16
2.2.2 Strålingens vekselvirkning med materie.....	16
<b>2.3 Strålingsbiologi.....</b>	<b>17</b>
2.3.1 Cellulær strålerespons .....	17
2.3.2 Celleoverlevelseskurver .....	18
2.3.3 Fraksjonert bestråling.....	20
2.3.4 Hypersensitivitet og induert stråleresistens .....	21
2.3.5 Adaptiv effekt .....	23
2.3.6 Indusert bortfall av HRS .....	24
 <b>3 Materialer og metoder.....</b>	 <b>25</b>
<b>3.1 Cellelinjen .....</b>	<b>25</b>
<b>3.2 Celledyrking .....</b>	<b>26</b>
3.2.1 Utstyr/kjemikalier og sterile rutiner.....	26
3.2.2 Celleomsetting .....	26
<b>3.3 Bestråling .....</b>	<b>27</b>
<b>3.4 Filmforsøk.....</b>	<b>28</b>
3.4.1 Utsåing .....	28
3.4.2 Effektdosebetråling med røntgenstråling.....	28
3.4.3 Bildeopptak ved ”time-lapse” filming .....	28
3.4.4 Filmobservasjon og overlevelsesanalyse .....	30
3.4.5 Signifikanstest.....	32
<b>3.5 Koloniforsøk .....</b>	<b>34</b>
3.5.1 Utsåing .....	34
3.5.2 Bestråling .....	34
3.5.3 Inkubering og fiksering.....	34
<b>3.6 Celleoverlevelse koloniforsøk.....</b>	<b>34</b>
3.6.1 OverlevelsEFRaksjon.....	34
3.6.2 Multiplisitetsskorreksjon .....	35
3.6.3 Middelverdiberegning.....	37

3.6.4 Representasjon av overlevelsesdata .....	38
<b>4 Resultater .....</b>	<b>39</b>
4.1 Koloniforsøk .....	39
4.1.1 Koloniforsøk med uprimede T-47D-celler .....	39
4.1.2 Koloniforsøk med T-47D-celler primet med lav doserate (LDR) bestråling ..	40
4.2 Filmforsøk.....	43
4.2.1 Overlevelse .....	43
4.3 Cellulære hendelser som kan påvirke koloniantallet .....	48
4.3.1 Hendelser som kan øke koloniantallet .....	48
4.3.2 Hendelser som kan redusere koloniantallet .....	54
4.3.3 Andre observerte cellulære hendelser .....	57
<b>5 Diskusjon .....</b>	<b>60</b>
5.1 Koloniforsøk .....	60
5.1.1 Koloniforsøk med uprimede T-47D-celler .....	60
5.1.2 Koloniforsøk med T-47D-celler primet med lav doserate (LDR) bestråling ..	60
5.2 Filmforsøk.....	61
5.2.1 Dublettdeling, kolonideling og cellemigrasjon.....	61
5.2.2 Cellebortfall ved mediumskift .....	63
5.2.3 Strengkolonier.....	64
5.2.4 Genomisk ustabilitet .....	64
5.2.5 Reell ”plating efficiency” .....	65
5.3 ”Plating efficiency” for uprimede T-47D-celler .....	66
5.3.1 HRS.....	67
5.4 ”Plating efficiency” i celler primet med lav doserate (LDR) bestråling.....	68
5.4.1 Oversving over 1.0 i overlevelsesfraksjon.....	69
5.4.2 Indusert bortfall av HRS .....	72
5.5 Koloniforsøk som metode.....	72
5.6 Svakheter og usikkerheter med utviklet filmmetode.....	73
5.6.1 Økt celletetthet og redusert forsøks tid .....	73
5.6.2 Kolonidefinisjon og kolonisammenvækst .....	74
5.6.3 Ulik tidsperiode frem til mediumskift, samt kryssbordbevegelse .....	74
5.6.4 Opptaksutsnitt .....	74
5.6.5 Subjektivitet .....	75
5.7 Feilkilder .....	75
5.7.1 Metode .....	75
5.7.2 Multiplisitet.....	75
5.7.3 Temperatur.....	76
5.8 Videre arbeid.....	76
5.8.1 Filmforsøk.....	76
5.8.2 ”Plating efficiency” og oversving over 1.0 i overlevelsesfraksjon.....	77
<b>6 Konklusjon.....</b>	<b>79</b>
<b>Referanser.....</b>	<b>80</b>

<b>Vedlegg A: Kjemikalieliste.....</b>	<b>85</b>
<b>Vedlegg B: Oppskrifter .....</b>	<b>86</b>
<b>Vedlegg C: Koloniforsøk.....</b>	<b>87</b>
<b>I Oversikt over koloniforsøkene .....</b>	<b>87</b>
<b>II Eksperimentielle rådata .....</b>	<b>88</b>
T-47D, akutt bestråling, ingen primingdose .....	88
T-47D-P, akutt røntgenbestråling, primet med 0.3 Gy LDR (0.3 Gy/time) [ <sup>60</sup> Co]- $\gamma$ -stråling den 17.08.2005.....	92
<b>Vedlegg D: Filmforsøk.....</b>	<b>95</b>
<b>I Observasjonsskjema.....</b>	<b>95</b>
T-47D, ubestrålt .....	96
T-47D, ingen priming, 0.3 Gy effektdose.....	103
T-47D-P, ingen effektbestråling .....	111
T-47D-P, 0.3 Gy effektdose.....	118
<b>II “Plating Efficiency” .....</b>	<b>124</b>
Per bildesnitt .....	124
Per celleflaske, der hver celleflaske består av tre bildesnitt .....	126
<b>III Cellulære hendelser som kan påvirke celleoverlevelsen.....</b>	<b>127</b>
Dublettdeling.....	127
Kolonideling .....	129
Cellemigrasjon .....	132
Mediumskift.....	137

## Sammendrag

Det har de siste årene blitt påvist stor strålefølsomhet i celler bestrålt med doser under 0.5 Gy i en rekke ulike celletyper. Dette fenomenet kalles hypersensitivitet (HRS). Effektbestrålinger utført i denne oppgaven med doser under 1 Gy bekrefter at T-47D-cellene uttrykker hypersensitivitet (HRS).

En liten stråledose (primingdose) kan indusere stråleresistens før en etterfølgende dose (effektdose), slik at effekten av den siste dosen reduseres (Olivieri et al. 1984). Dette fenomenet kalles adaptiv effekt. Det er også vist at en primingdose kan redusere eller oppheve HRS (Marples og Joiner, 1995). T-47D-cellene i denne oppgaven viste bortfall av HRS (heretter kalt induisert bortfall av HRS) og økte overlevelsesfraksjoner når effektdoser under 1 Gy ble gitt inntil 109 uker etter en 0.3 Gy LDR-primingdose. (LDR står for "lav doserate", her 0.3 Gy/time.) Effektbestrålingen av LDR-primede celler ga overlevelsesfraksjonene over 1.0, noe vi i denne oppgaven har valgt å kalle oversving over 1.0 i overlevelsesfraksjon.

Formålet med foreliggende oppgave er å undersøke mulige forklaringer på oversving over 1.0 i overlevelsesfraksjon og induisert bortfall av HRS ved å studere utviklingen fra en kolonidannende enhet frem til koloni (eller kolonier, eller mangel på koloni). For å studere vekstmønsteret til cellen ble det i denne oppgaven benyttet "time-lapse" film. Ut fra filmobservasjoner ble det etablert metoder for å kvantifisere de ulike hendelsesforløpene de kolonidannende enhetene kunne gjennomføre, og det ble kartlagt om de ulike forløpene inneholdt effekter som kunne påvirke koloniantallet. For å undersøke om eventuelle påvirkninger varierte som følge av priming og effektbestråling, ble filmopptaket utført på ubestrålte T47D-celler, samt T-47D-celler etter enten LDR-priming eller effektdose, eller begge deler. Primingdosen ble levert 17. august 2005 ved lav doserate (0.3 Gy/time) [ $^{60}\text{Co}$ ]- $\gamma$ -stråling av Edin, mens effektdosen ble levert umiddelbart før filmstart ved akutt (30 Gy/time) røntgenstråling. Dosen til cellene var alltid 0.3 Gy ettersom utførte koloniforsøk indikerte at T-47D-cellene viste størst uttrykk av HRS ved denne dosen.

Filmobservasjon avslørte flere effekter som påvirket koloniantallet, men antallet observerte hendelser som medførte reduksjon i antall kolonier var neglisjerbart. Opp til 7.5% av de utsådde klonogene cellene ble observert å danne flere kolonier, enten ved dublett- eller kolonideling eller ved cellemigrasjon. Det er en tendens til slike prosesser i alle prøver, men de er mest utbredt for bestrålte celler. At enkelte av de utsådde celler kan danne flere enn en koloni betyr at den målte celleoverlevelsen ikke nødvendigvis gjengir andelen klonogene celler, men overestimerer denne. I et forsøk på å bestemme den reelle celleoverlevelsen ble den målte overlevelsen korrigert for andelen kolonionøkende bidrag, og funnet til:



- ~ 82.0% for ubestrålte celler
- ~ 69.5% for uprimede celler etter effektdose
- ~ 76.0% for primede celler
- ~ 84.0% for primede celler etter effektdose

Overraskende nok viste det seg at uttrykket av HRS og oversvinget økte når celleoverlevelsen ble korrigert, noe som betyr at uttrykket av disse effektene er større enn hva den målte celleoverlevelsen for både film- og koloniforsøk tilsier. Dette betyr at de observerte effektene ikke kan forklare hverken HRS, oversving over 1.0 i overlevelsesfraksjon eller induisert bortfall av HRS, men at de tvert imot maskerer deler av effektene.

Ettersom mekanismene bak oversving og induisert bortfall av HRS ikke kan observeres i filmene, ledet dette til nye spekulasjoner angående effektens opprinnelse:

Oversvinget over 1.0 i overlevelsesfraksjon i LDR-primede celler kan muligens skyldes at effektdosen øker cellenes feste til underlaget. Data i denne oppgaven motsier ikke en slik mulighet ettersom bortfallet av andelen klonogene enheter ved mediumskift reduseres når LDR-primede celler mottar en 0.3 Gy effektbestråling.

En annen mulig teori er at oversvinget over 1.0 i overlevelsesfraksjon skyldes at effektdosen stimulerer celler ut av  $G_0$  og inn i celledyklus. Våre data kan ikke gi noen indikasjoner på dette ettersom vi med det blotte øyet ikke kan skille  $G_0$ -celler fra uklonogene celler.

Mekanismene bak HRS og adaptivt fravær av denne er ikke fullstendig kartlagt. HRS har blitt foreslått å gjenspeile manglende arrest for  $G_2$ -celler bestrålt med doser under 0.4 Gy, ved at disse unnslipper et ATM-avhengig  $G_2/M$ -kontrollpunkt og entrer mitose med skader (Marples et al. 2003; 2004). Edin et al (2007) foreslår at det induserte bortfallet av HRS kan skyldes at primingdosen gjør dette kontrollpunktet permanent tilgjengelig for cellene selv ved små stråledoser, slik at disse opplever  $G_2$ -arrest. Celleoverlevelsesdata i denne oppgaven bestrider ikke Edins teori.

Lavere "PE" for primede enn for uprimede celler i forsøk uten effektdose, i kombinasjon med nogenlunde lik "PE" for ubestrålte celler og primede celler etter effektdose, kan tyde på at effektdosen gitt primede celler opphever effekten av primingdosen, men det ser ikke ut til at dette alene kan forklare den store økningen i overlevelsesfraksjon

For å trekke endelige slutninger er det nødvendig med ytterligere undersøkelser.

## Summary

Investigations over the past years have revealed a region of high radiosensitivity for cells irradiated with doses below 0.5 Gy in several cell lines. This phenomenon has been termed low dose hyper-radio-sensitivity (HRS). In this thesis T-47D-cells expressed HRS when x-irradiated with doses below 1 Gy.

If a small dose (priming dose) is given prior to a challenge dose, the effect of the challenge dose is reduced (Olivieri et al. 1984). This phenomenon is termed adaptive response. Studies have also shown that a priming dose may reduce or eliminate the HRS (Marples and Joiner, 1995). HRS was eliminated in the T-47D-cells used in this thesis when irradiated with challenge doses below 1 Gy for as long as 109 weeks after exposure to a 0.3 Gy low dose rate (LDR) priming dose. In fact the cells responded with surviving fractions above 1.0 i.e. the "plating efficiency" was higher in LDR-primed cells that received a challenge dose than in those that did not.

The aim of this thesis was to investigate possible mechanisms behind surviving fractions above 1.0 and the elimination of HRS by studying how clonogenic units develop into colonies (or do not). In order to study the growth patterns of the cells, "time-lapse" filming was used. Methods were established to quantify the different growth patterns of the clonogenic units, and investigations concerning whether or not differences in growth pattern could influence the number of established colonies, were carried out. In order to examine whether these possible influences varied due to a priming- or a challenge dose, "time-lapse" film was carried out on unirradiated cells, as well as cells exposed to either a priming- or a challenge dose, or both. The priming irradiation took place the August 17<sup>th</sup> 2005 by Edin, and the dose was delivered at low dose rate (0.3 Gy/hour) [<sup>60</sup>Co]- $\gamma$ -irradiation. The challenge dose was delivered immediately prior the filming with acute (30 Gy/hour) x-irradiation. The dose was always 0.3 Gy, as prior investigations showed that the cells expressed maximum HRS at this dose.

The films revealed several effects that influenced the number of colonies, but only an insignificant number of events were seen to decrease the number of colonies. Up to 7.5% of the seeded cells were observed to form more than one colony, either by division of cell-doublets or of colonies or by cell migration. The amount of seeded cells that form multiple colonies seems to increase due to irradiation. Since some of the seeded cells were observed to form multiple colonies, the measured cell survival did not represent the amount of clonogenic cells. In fact the measured cell survival overestimates the true survival. In an attempt to establish the true cell survival, the measured survival was corrected for the effects increasing the number of colonies, and calculated to:

- ~ 82.0% in unirradiated cells
- ~ 69.5% in cells after a challenge dose
- ~ 76.0% in primed cells
- ~ 84.0% in primed cells after a challenge dose

Suprisingly, the correction tended to increase the expression of both HRS and surviving fraction above 1.0, indicating that the true effects are underestimated by the measured cell survival. This suggest that HRS and the elimination of HRS can not be explained by effects increasing the number of colonies, as they are seen to counter-act and partially mask the mentioned phenomena.

Since explanations concerning surviving fractions above 1.0 and the elimination of HRS were not revealed by “time-lapse” film, speculations were raised concerning the origin of the effects:

The surviving fractions above 1.0 in LDR-primed cells are possibly due to the effect dose improving the cells attachment to the surface if the cell flask. The results in this thesis does not contradict such a possibility as the loss of clonogenic units at medium change were seen to decrease as the LDR-primed cells were exposed to a challenge dose.

Another possible theory is that the surviving fraction above 1.0 in LDR-primed cells is due to the effect dose stimulating  $G_0$ -cells to enter cell cycle. Our data can neither support nor disprove such a theory as it is difficult to separate  $G_0$ -cells from other cells in the “time-lapse” films.

The mechanisms inducing HRS and the elimination of HRS are not clear. HRS has been suggested to represent lack of  $G_2$ -arrest for cells irradiated with doses lower than 0.4 Gy in  $G_2$ , by escaping the ATM-dependent  $G_2$ /M-checkpoint and progress into mitosis with injuries (Marples et al. 2003; 2004). Edin et al (2007) suggested that the elimination of HRS is a result of the LDR-priming dose making the  $G_2$ /M-checkpoint permanently available to the cells, even at low doses. The cell survival data in this thesis support Edin’s theory.

Lower cell survival in LDR-primed than in unirradiated cells, combined with approximately the same survival level in unirradiated cells and cells exposed to both a priming- and a challenge dose, suggest that the challenge dose given LDR-primed cells abolish the effect induced by the LDR-priming dose.

For any conclusions to be drawn, further investigations are required.

## Forkortelser og definisjoner

<b>Cellemigrasjon:</b>	En celle migrerer ut av en koloni
<b>DSB:</b>	Dobbeltrådbrudd (double strand break). Brudd i begge DNA-trådene, dvs. kromosombrudd
<b>Dublettdeling:</b>	En dublett splittes opp til to enkeltceller
<b>Effektdose:</b>	Dose gitt cellene som påvirker celleoverlevelsen. I denne oppgaven har celle blitt eksponert for effektdoser opptil 2 Gy, levert ved akutt (30 Gy/time), dvs. høy doserate røntgenstråling
<b>HRS:</b>	Hypersensitivitet (hyper-radiosensitivity). Det at celler viser eksepsjonelt stor strålefølsomhet i doseområdet 0 - 0.5 Gy
<b>HDR:</b>	Høy doserate (high dose rate). I denne oppgaven 30 Gy/time
<b>Indusert bortfall av HRS:</b>	Økt celleoverlevelse for primede celler etter en 0.3 Gy effektbestråling
<b>IR-modell:</b>	Induced repair model. Modell for beskrivelse av celleoverlevelse for celler som uttrykker HRS fremlagt av Joiner og Johns (1988)
<b>IRR:</b>	Indusert stråleresistens (induced radioresistance). Økt stråleresistens når dosen overskrider doseområdet som gir HRS
<b>Koloni:</b>	En koloni defineres i denne oppgaven ulikt ved film- og koloniforsøk. Ved koloniforsøk er en koloni en ansamling inneholdende minst 50 celler. Ved filmforsøk har vi valgt å definere en koloni som en ansamling med minst 6 celler, der det har skjedd celledeling innen siste syklustid, dvs. siste 30 timer
<b>Kolonideling:</b>	En koloni deles opp til to celleansamlinger bestående av minst to celler
<b>LDR:</b>	Lav doserate (low dose rate). I denne oppgaven 0.3 Gy/time
<b>LET:</b>	Linear Energy Transfer
<b>LQ-modell:</b>	Linear quadratic model. Modell for beskrivelse celleoverlevelse fremlagt av Sinclair (1966)
<b>Overlevelsesfraksjon:</b>	Overlevelsesfraksjon er definert som "PE" for celler etter effektdose dividert med "PE" for celler uten effektdose:

$$\text{Overlevelsesfraksjon} = \frac{PE \text{ (med effektdose)}}{PE \text{ (uten effektdose)}}$$

**”Plating efficiency” (PE):** ”Plating efficiency” er definert som antall dannede kolonier,  $N_K$ , dividert med antall utsådde celler,  $N_C$ , i samme flaske:

$$PE = \frac{N_K}{N_C}$$

**Reell ”Plating efficiency” (Reell PE):** Reell ”Plating efficiency” er definert som det reelle antallet kolonier dannet,  $N_{KR}$ , (dvs. fratrukket artefakter), dividert med antall utsådde celler,  $N_C$ , i samme flaske:

$$PE = \frac{N_{KR}}{N_C}$$

**Primingdose:** Liten stråledose som gis cellene. T-47D-cellene i foreliggende oppgave ble primet 17.august 2005 med en 0.3 Gy stråledose, levert ved lav doserate (0.3 Gy/time) [ $^{60}\text{Co}$ ]- $\gamma$ -stråling. Primingen ble utført av Edin

**SSB:** Singeltråddbrudd (singel strand break). Brudd i den ene av DNAs to tråder

**Strengkoloni:** En koloni der flere av nabocellene er bundet til hverandre ved en felles tynn membranstreng

**T-47D:** Humane brystkreftceller med normal RB-funksjon, men defekt p53-funksjon. Denne betegnelsen brukes på den ubestrålte villtypen av cellene

**T-47D + 0.3 Gy:** T-47D-celler bestrålt med 0.3 Gy effektdose ved akutt HDR (30 Gy/time) røntgenstråling

**T-47D-P:** T-47D-celler primet med lav doserate LDR (0.3 Gy/time) [ $^{60}\text{Co}$ ]- $\gamma$ -stråling 17.august av Edin. Dosen var 0.3 Gy

**T-47D-P + 0.3 Gy:** T-47D-P-celler vestrålt med en 0.3 Gy effektdose ved akutt HDR (30 Gy/time) røntgenstråling

**Vandrende cellekompleks:** En celle eller ansamling av flere celler, som viser betydelig samlet vandring og som i noen tilfeller ser ut til å søke mot andre kolonier

**(X; Y):** ”Plating efficiency” og overlevelsesfraksjonene ble i filmforsøkene både beregnet per bildesnitt og per celleflaske, der hver celleflaske besto av 3 bildesnitt. Ettersom det ikke var innlysende hvilken av metodene som var mest korrekt, ble det valgt å presentere verdiene fra begge metodene i teksten som (X; Y), der X representerer målingen per bildesnitt og Y målingen per celleflaske

# 1 Innledning

Den ioniserende strålingens evne til å drepe celler har vært kjent i lengre tid. Det tok under ett år fra røntgenstrålingen ble oppdaget i 1895 til stråling for første gang ble brukt i behandling av kreft. Siden den gang har det blitt utført betydelig forskning på cellenes respons på ioniserende stråling og etterhvert som ny kunnskap har blitt kjent har terapiformene blitt mer avanserte.

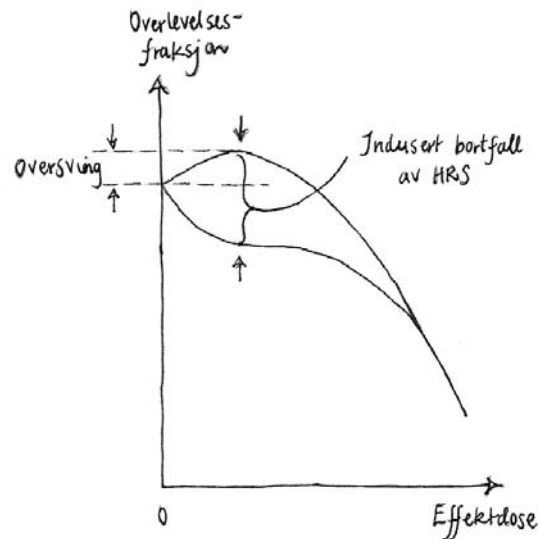
I dag brukes ioniserende stråling i stor grad til behandling av kreft, og tall fra 2000 viser at stråleterapi alene eller i kombinasjon med kirurgi kurerer nær 40% av alle krefttilfeller (Dale og Oughton, 2000). Målet med stråleterapi er å skape et behandlingsregime som eliminerer kreftcellene, men samtidig begrenser skadene til de normale cellene. For å gjøre dette på best mulig måte er god kjennskap til kreft- og normalcellenes strålerespons avgjørende.

Forskning har vist at mange kreft- og normalceller har en forhøyet strålesensitivitet for doser under 0.5 Gy (Marples og Joiner, 1993). Dette fenomenet kalles hypersensitivitet (HRS). Etter det hypersensitive doseområdet følger et område med økende stråleresistens for doser mellom 0.5-1 Gy, kalt induert stråleresistens (IRR). Hvordan HRS påvirker stråleterapien er ikke fullstendig kartlagt, men utførte undersøkelser viser at dosene gitt til normalcellene i forbindelse med fraksjonert stråleterapi ofte ligger i det hypersensitive doseområdet (Smith et al. 1999).

I stråleterapien benyttes fraksjonering for å begrense skaden til det normale vevet. Det er nærliggende å tro at HRS-fenomenet kunne utnyttes til å øke dødligheten blant kreftceller, men dette forutsetter at cellene responderer med HRS flere ganger etter hverandre. Studier viser imidlertid at når to doser gis etter hverandre virker den første stråledosen (fra nå av kalt primingdosen) beskyttende mot den neste (effektdosen) (Wouters og Skarsgard, 1997). Hvis de gjeldende dosene er i det hypersensitive doseområdet kan dette resultere i bortfall av HRS (Marples og Joiner, 1995). Tiden det tar før HRS er gjenvunnet har blitt vist å variere med doserate, og undersøkelser med 0.3 Gy lav doserate (LDR) primede T-47D-celler, som har mottatt en høy doserate (HDR) effektdose, viser at HRS forblir fjernet for lengre perioder (> 14 måneder), muligens permanent (Edin et al. 2007).

I denne oppgaven skal vi se nærmere på stråleresponsen til T-47D-celler. I den forbindelse har jeg valgt å introdusere en figur (figur 1.1) som gjengir dose-responskurven til T-47D-cellene som følge av priming og effektbestråling med [ $^{60}\text{Co}$ ]- $\gamma$ -stråling etter studier av Edin (2003) og Edin et al. (2007; 2008). Edin sine studier viste at villtype T-47D-celler uttrykkte HRS dersom de ble bestrålt med effektdoser under 1 Gy, dvs. at de følger det nederste kurveforløpet i figur 1.1. Dersom T-47D-cellene derimot ble gitt en 0.3 Gy LDR-primingdose før bestrålingen, fulgte dose-responskurven det øverste kurveforløpet i figur 1.1, dvs. at overlevelsesfraksjonen økte når cellene mottok en effektdose under 1 Gy. En slik økning i overlevelsesfraksjon har vi i denne oppgaven valgt å kalle **oversving over 1.0 i overlevelsesfraksjon** (se markering i figur 1.1).

Forskjellen i overlevelsesfraksjon mellom primede og uprimede T-47D-celler ved henholdsvis maksimalt over- og undersving har vi valgt å kalle **indusert bortfall av HRS**.



**Figur 1.1: Skisse av doserespons-kurve for T-47D- og T-47D-P-celler**

Figuren viser to dose-respons-kurver. Det nederste kurveforløpet gjenspeiler dose-responskurven fra Edin sitt studie (2003) med T-47D-celler bestrålt med HDR-effektdoser, hvilket resulterte i HRS-respons ved effektdoser under 0.5 Gy. Den øverste kurven gjenspeiler dose-responskurven fra Edin et al. sitt studie (2007; 2008) med 0.3 Gy LDR-primede T-47D-celler, heretter kalt T-47D-P-celler, etter eksponering for HDR-effektdoser. Kurven har overlevelsesfraksjon over 1.0 ved doser under 0.5 Gy. I figuren er det også definert to begreper, oversving og indusert bortfall av HRS. Oversvinget representerer økningen over 1.0 i overlevelsesfraksjon, mens indusert bortfall av HRS representerer forholdet i overlevelsesfraksjon mellom maksimalt over- og undersving (HRS).

Formålet med denne masteroppgaven er å undersøke mulige forklaringer på oversvinget over 1.0 i overlevelsesfraksjon og indusert bortfall av HRS, ved å studere utviklingen fra en kolonidannende enhet og frem til koloni (eller kolonier, eller mangel på koloni).

For å undersøke dette ble det benyttet "time-lapse" film. Ved "time-lapse" film gis man, i motsetning til koloniforsøk, muligheten til å følge utviklingen til hver enkelt kolonidannende enhet gjennom hele forsøket. Ved å etablere gode metoder til å registrere eventuelle alternative hendelsesforløp en celle kan gjennomgå, ble det undersøkt om cellenes delings- eller vekstmønster påvirkes av priming og effektbestråling og om disse endringene kan forklare oversving over 1.0 i overlevelsesfraksjon og indusert bortfall av HRS.

Det ble i hovedsak utført to typer forsøk, der de første var innledende koloniforsøk for å sikre at cellene uttrykker HRS og at denne oppheves dersom cellene gis en LDR-priming før en etterfølgende effektbestråling.

Hovedparten av eksperimentene var filmforsøk, dvs. "time-lapse" filmede koloniforsøk. De filmede cellepopulasjonene var i denne oppgaven både ubestrålte celler og celler som har mottatt enten LDR-priming eller effektdose, eller begge deler. Hver dose gitt cellene var lik 0.3 Gy ettersom koloniforsøkene viste størst uttrykk av HRS ved nettopp denne dosen. Primingdosen ble levert 17. august 2005 ved lav doserate (0.3 Gy/time) [ $^{60}\text{Co}$ ]- $\gamma$ -stråling av Edin, mens effektdosene ble levert umiddelbart før filmstart med akutt (HDR) (30 Gy/time) røntgenstråling.



## 2 Teori

### 2.1 Cellebiologi

Delkapitlene 2.1.1 – 2.1.4 baserer seg på kapittel 16-17 i *Molecular biology of the cell* (Alberts et al. 2002) og kapittel 9 i *Cell and molecular biology* (Karp 2002)

#### 2.1.1 Cellesyklus

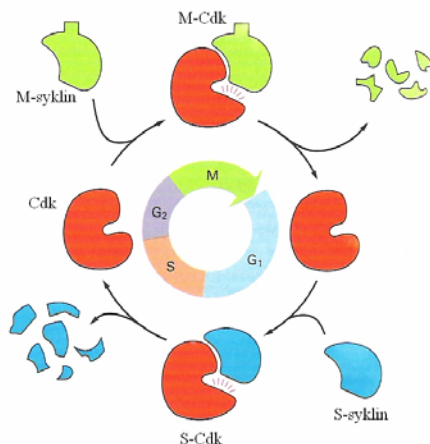
Celler prolifererer ved å dele seg etter at cellens innhold og størrelse er duplisert. Dette gjentakende hendelsesmønsteret betegnes cellesyklus.

Cellesyklus deles inn i to hovedfaser, mitose (M-fase) og interfase. Mitosen representerer delingsfasen og varer omtrent 1 time for de fleste celler. Interfasen representerer tidsrommet mellom to mitoser og er den tiden cellen bruker å doble sitt innhold og volum. Interfasen deles inn i fasene  $G_1$ , S og  $G_2$ .

S-fasen er fasen der cellens DNA syntetiseres (S = syntese), mens G-fasene (G = gap) gir cellene tid til cellevekst, samt til å klargjøre seg for henholdsvis DNA-syntese og deling.

#### 2.1.2 Regulering av cellesyklus

I kontrollpunktene mellom de ulike cellesyklusfasene undersøker cellen sitt indre og ytre miljø, samt vekstforhold og det avgjøres hvorvidt den kan fortsette sin progresjon gjennom syklus. Progresjonen styres av et nettverk av proteiner som til sammen utgjør cellesykluskontrollen. Proteinene, der de viktigste er komplekser av sykliner og syklinavhengige kinaser (Cdk), trigger overganger fra en cellesyklusfase til neste ved å fosforylere målproteiner som bringer cellen forbi kontrollbarrieren og setter de prosesser igang, som kjennetegner neste fase. Cdk-proteinet aktiveres ved binding til en passende syklin hvilket resulterer i en syklin-Cdk kinase. Aktiviteten til syklin-Cdk komplekset varierer gjennom cellesyklus, ettersom de ulike syklinene, i motsetning til Cdk-proteinet, syntetiseres og degraderes periodisk avhengig av om en cellesyklushendelse skal startes eller avsluttes. Dette er med å hindre at en hendelse skjer på feil tidspunkt, under feil mikromiljøbetingelser, eller at det skjer flere ganger hvilket kan være kritisk for cellen.



**Figur 2.1: Oversikt over cellesyklusens kontrollsystem.**

Cdk aktiveres ved binding til aktuelt syklin. Syklin-Cdk-kompleksene tillater cellen overgang fra en cellesyklusfase til den neste. Degradering av syklin deaktiverer Cdk (Alberts et al. 2002, modifisert).

Cellen har fire viktige kontrollpunkter orientert i henholdsvis  $G_0$ -,  $G_1$ -,  $G_2$ - og M-fase. I tillegg er det vanlig idag å regne hele S-fase som et eget kontrollpunkt, siden pågående DNA-syntese kan slås av ved å deaktivere et lignende proteinkompleks som det som styrer de øvrige kontrollpunktene. I kontrollpunktene mottar cellen tilbakemeldinger gjennom intracellulære signaler fra cellesykluskontrollen om prosessene som utføres, men kan også påvirkes ekstracellulært av blant annet vekstfaktorer. På denne måten sikrer cellen seg at nye hendelser ikke initieres før foregående er utført og at cellen ikke deler seg uten kontroll av organismen/vevet.

Kontrollpunktet,  $M_k$ , aktiveres i mitosens metafase. Her sjekker cellen at kromosomene er festet og riktig plassert på den mitotiske spindelen. Er dette tilfelle gis cellen startsignal for celledeling. Kontrollpunktene  $G_1k$  og  $G_2k$  er orientert i henholdsvis slutten av  $G_1$ - og  $G_2$ -fase. Her kontrolleres cellens indre og ytre miljø og det avgjøres om DNA-syntese/mitose skal initieres. Dersom cellen er skadet eller miljøet lite tilfredstillende kan cellen holdes igjen i fasene for tid til reparasjon.  $G_1k$  kan og initiere apoptose, dvs. programmert selvmord, dersom dette er hensiktsmessig for organismen, samt sende cellen til hvilefasen,  $G_0$ . Cellens eventuelle tilbakevending til syklus bestemmes av kontrollpunktet  $G_0k$  i  $G_0$ .  $G_0k$  styres av ekstracellulære vekstfaktorer som festes til cellemembranens reseptorer. Dette utløser, hvis antall vekstfaktorer er tilstrekkelig, en rekke intracellulære fosforyleringer og uttrykk av spesifikke proliferasjonsgener (proto-oncogener), hvilket bringer cellen forbi  $G_0k$  og inn i syklus.

To viktige genprodukter fra antiproliferasjonsgenene, p53 og pRB, virker cellesyklusregulerende ved at de kan hindre/initiere ulike cellesyklus hendelser.

pRB kan hindre DNA-syntese ved binding av gentranskripsjonregulerende proteiner nødvendige for passering av  $G_1k$ . Bindingen bidrar å holde cellen tilbake i  $G_1k$ , hvilket hemmer proliferasjonen og gir cellen tid til eventuell reparasjon.

pRBs aktivitet endres gjennom syklus ved en rekke defosforyleringer og fosforyleringer i pRBs bindingssteder. Aktiviteten av pRB er høy i hvilefasen,  $G_0$ , og i andre tilfeller der proliferasjonen ønskes hemmes. Dersom det derimot er ønskelig at cellen skal gjenoppta progresjonen gjennom syklus, fosforyleres pRB slik at eventuell binding til de gentranskripsjonsregulerende proteinene brytes, og de nødvendige genene for at overgang skal skje, transkripterer.

p53, viss konsentrasjon øker når cellen utsettes for ioniserende stråling, hindrer cellen å initiere DNA-syntese ved at den holdes igjen i  $G_1k$ . Dette gjøres ved å stimulere transkripsjon av genet p21 hvilket hindrer  $G_1$  syklin-Cdk komplekset å fosforylere og på den måten inaktivere p53. Denne mekanismen er av stor viktighet ettersom den hindrer celler å gå inn i syntesefase med skader, slik at de gis tid til reparasjon. Dersom reparasjonen skulle mislykkes eller være for krevende kan p53 lede cellen i apoptose, og på den måten unngå en videreføring av skaden.

Mutasjon av p53 er tilfelle for over halvparten av alle krefttilfeller.

### 2.1.3 Cellens morfologi

Eukariote celler holdes sammen av et nettverk av filamenter betegnet cytoskjelettet. Cytoskjelettet gir cellen mekanisk styrke, og kontrollerer dens form og bevegelse.

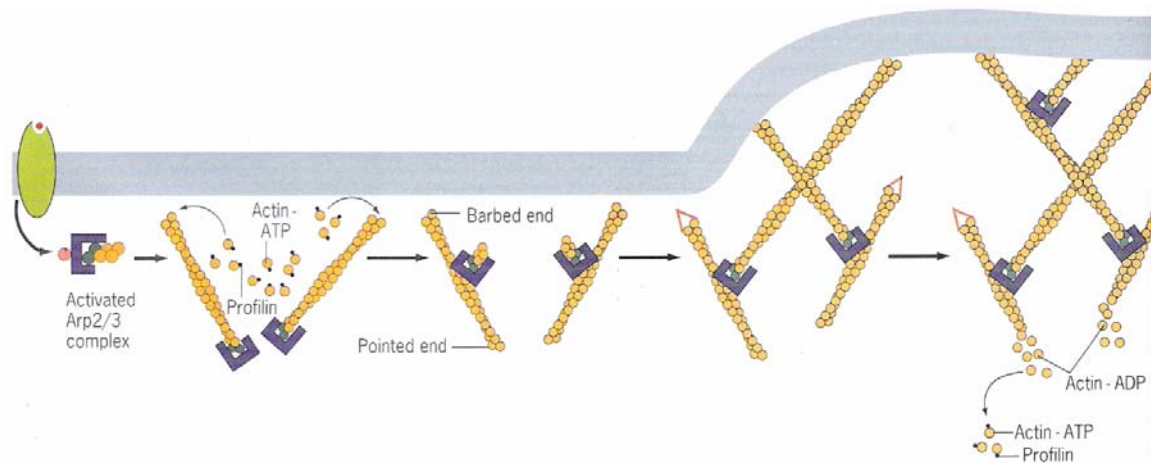
Filamentene er sammensatt av en rekke ulike proteiner, der aktin og tubulin er to av de viktigste.

Tubulin, som bygger opp mikrotubuli, er ansvarlig for cellens organellposisjonering, indre transport og plassering av kromosomparene langs cellens ekvatorplan under delingsfasen. Mikrotubuli strekker seg på langs og tvers av cellen, og bidrar til å holde cellen sammen, i tillegg til å forme den.

Aktinfilamenter, også kjent som mikrofilamenter, består av lange dobbelthelikser av proteinet aktin. Filamentene utgjør en rekke statiske, transiente og dynamiske strukturer som er viktige for cellens indre og ytre bevegelser, samt celleoverflatens form.

Aktinfilamentenes oppførsel og organisering reguleres av en rekke aktinbindende proteiner. Disse fremmer/hindrer dannelse av polymerkjeder og polymernetverk ved å binde seg til disse under påvirkning av spesifikke intra- og ekstracellulære signaler. Et av disse proteinene, profilin, fremmer filamentdannelse ved binding til frie aktinmonomerer. Dersom dannelse av aktinfilamenter er ønskelig hektes aktinproteinene sammen i mindre grupper, før de videre inkorporeres i aktinpolymeren. Sammenhekten av monomerene reguleres av det aktinbindende proteinkomplekset Arp 2/3 (Actin-related proteins), mens inkorporeringen av gruppene i polymeren skjer ved polarisasjon i nærvær av ATP.

Ved en gitt tid etter en slik inkorporering hydrolyseres ATP-aktin til ADP-aktin ved at profilin hektes av molekylet. Filamentet løses deretter opp, dersom dette er ønskelig, ved at aktin-ADP-gruppene hektes av polymeren. Monomerene skilles videre fra ADP og bindes av spesifikke sekvesterasjonsproteiner for å hindre dannelse av nye filamenter, eller genfosforyleres til aktin-ATP ved binding til profilin. Siste alternativ åpner for resirkulering, slik at aktin-ATP kan brukes på ny til dannelse av nye filamenter.



**Figur 2.2: Sammenheking av aktinfilamenter og aktinnettverk**

Et aktinfilament dannes ved at aktinmonomerer inkorporeres i filamenter under regulering av proteinkomplekset Arp2/3. Dannelse av slike filamenter stimuleres av en rekke aktinbindende molekyler, deriblant profilin, som bindes til de frie aktinmonomerene under påvirkning av spesifikke intra- og ekstracellulære signaler. Etter monomerinkorporeringen hydrolyseres aktin-ATP til aktin-ADP ved at profilinmolekylet hektes av. Dannelse av aktinnettverk skjer ved at to og to aktinfilamenter festes til hverandre gjennom binding til samme krysslinkede protein (Karp 2002, modifisert).

Ettersom ATP gir asymmetriske monomerpolarisasjoner, gis de individuelle filamentene usymmetriske sluttstykker (Mogilner og Oster 2003). Detaljene omkring prosessen er pr. dags dato ikke kjent, men resulterer i avvikende monomeraffinitet endene imellom. I hovedsak medfører dette aktinsammenkobling i positiv ende og aktinfrigjøring i negativ ende av filamentet. Ubalanse mellom disse prosessene kan medføre "treadmilling"; en prosess der monomerer hektes av og på polymeren med samme hastighet, slik at filamentets lengde holdes konstant.

Filamentene kan binde seg sammen og danne større intracellulære nettverk, hvilket gir cellen økt mekanisk styrke og fleksibilitet. Nettverkene oppstår ved at to og to filamenter hektes 70° på hverandre gjennom binding til samme krysslinkede protein. Proteiner tilhørende denne gruppen inneholder 2-3 spesifikke bindings seter og kan på denne måten danne bindeledd mellom flere filamenter i nettverket.

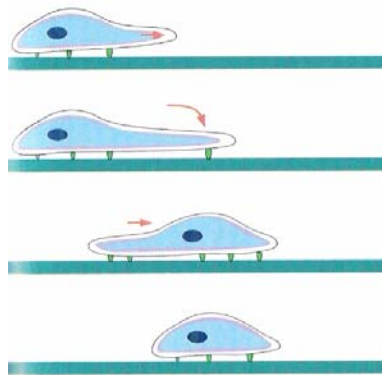
Filamentene kan i tillegg til å feste seg til hverandre og andre aktinrelaterte molekyler, feste seg til membranproteiner på cellemembranen. Dette gir filamentene mulighet å utøve press direkte på celleveggene og på denne måten stimulere cellen til bevegelse. Cellemembranens elastisitet og styrke gjør dette, samt celledeling mulig, grunnet sin spesielle sammensetning av lipider og proteiner. Den 6 nm tykke lipidbarrieren regulerer transporten og signaloverføringen inn og ut av cellen, og separerer intracellulærvæsken fra ekstracellulærvæsken.

#### **2.1.4 Cellebevegelse**

Cellebevegelse er sentralt for utvikling og opprettholdelse av organismens livsfunksjon. Det danner grunnlaget for oppbygningen av nervesystemet og bidrar til forsvar mot indre og ytre farer. I tillegg er cellemigrering en avgjørende faktor i kreftmetastasering, der primærceller spres ved hjelp av blodomløpet eller lymfesystemet til et annet sted i kroppen.

Cellebevegelse initieres ved at ekstracellulære signaler aktiverer proteinkomplekset Arp2/3. Dette resulterer, som tidligere nevnt, i sammensetning av aktinfilamenter som ved hjelp av ulike aktinbindende proteiner hektes sammen til større nettverk. Nettverkene utvides videre ved at aktinproteinene i bakre del (relativt til bevegelsesretningen) hektes av, for så å diffundere til fremre del av nettverket og inkorporeres her. Etterhvert som nettverkets utstrekning øker, presses cellemembranen i stimulusretningen, noe som resulterer i cytoskjelettekstensjon i den cortiske sonen av cellen. Denne ekstensjonsstrukturen betegnes lamellipodia, en dynamisk overflatestruktur hvilket strekker og fester seg til midlertidige bindings seter i underlaget (substratum).

Etter oppnådd temporær binding skyves den resterende delen av cellen (lamella) mot lamellipodia slik at cellens tyngdepunkt flyttes fremover. Cellens bakende løftes videre opp, før bevegelsen fullføres ved at denne trekkes mot tyndepunktet i cellen.



### **Figur 2.3: Cellebevegelse**

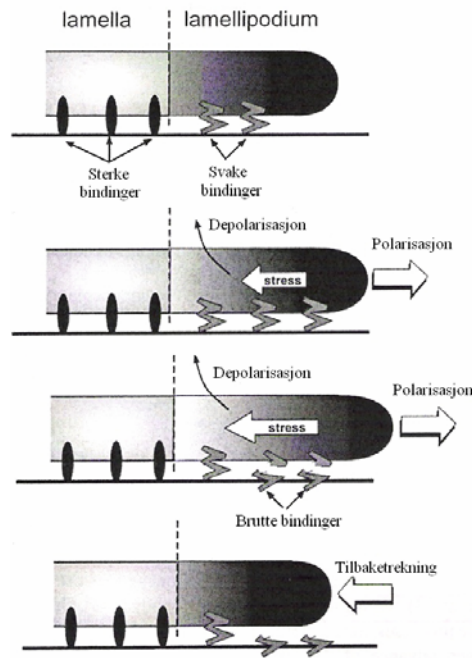
*Cellebevegelse initieres ved en ekstensjon i front av cellen (relativt til bevegelsesretningen), for så at cellens tyngdepunkt flyttes fremover. Bevegelsen avsluttes ved at cellens bakende løftes og trekkes fremover. (Karp 2002, modifisert)*

Av cellens bevegelsesmekanismer er systemet i front av cellen best kartlagt. Cellens fremre bevegelsesdel består av to hoveddeler; filopodia og lamellipodia.

Filopodia, som springer ut fra lamellipodia, er sammensatt av et 1-dimensjonalt aktinnettverk. Den består av en rekke mikropikes, som representerer cellens sensorsystem med hensyn til miljøet i bevegelsesretningen.

Lamellipodia på sin side, brer seg som en flate ut fra lamella, med bredde målede flere titalls  $\mu\text{m}$  (Abraham et al. 1999). Den 0.1-0.2  $\mu\text{m}$  tykke strukturen, hvilket er bygd opp av et 2-dimensjonalt aktinnettverk, inneholder hoveddelen av den fremre cellens bevegelsesmaskineri. Undersøkelser i mikroskop viser at lamellipodia gjennomgår en rekke periodiske kontraksjoner, avhengige av dens bredde og anvendt substrat (Giannone et al. 2004). Samtidig observeres samsvar mellom periodisk kontraksjonstid og MLCK samt alfa-aktinin forflytningstid fra fremre til bakre del av lamellipodia. Gruppen foreslår at dette kan være kontraksjonsinitierende signalmolekyler, som ved filamentoppløsning diffunderer med/uten aktinmolekylene til fremre/bakre del av lamellipodia, der de reagerer og utløser periodiske oscillasjoner. Alternativt kan en enzymatisk påvirkning initiere prosessene ved å aktivere de spesifikke signalmolekylene.

I stick-slip-modellen, framlagt av Wolgemuth (2005), foreslås kontraksjonsmønsteret å skyldes aktinnettverkets polarisasjonsegenskaper. En polarisering vil, som tidligere nevnt, gi fremadgående bevegelse grunnet aktinfilamentenes evne å utføre press på cellemembranen. Depolarisering vil derimot kunne skape strekk i cellen ettersom aktinnettverkets volum avtar. Denne belastningen kan, dersom den blir tilstrekkelig, bryte lamellipodias binding til de midlertidige bindingssetene, slik at denne trekkes tilbake mot lamella. Dette repeterende hendelsesforløpet av binding og bindingsbrudd resulterer i periodiske lamellipodiakontraksjoner.



**Figur 2.4: Stick-slip modellen**

*Polarisering vil gi en lamellipodiaekstensjon i front av cellen som fester seg til midlertidige bindingssteder i underlaget. En depolarisering vil skape strekk i denne strukturen. Dersom denne blir tilstrekkelig kan den bryte lamellipodias binding til underlaget, slik at denne trekkes tilbake mot lamella. Et slikt repeterende hendelsesforløp av binding og bindingsbrudd ses som periodiske lamellipodiakontraksjoner. (Wolgemuth 2005, modifisert)*

Bevegelsesmønsterets substratavhengighet foreslås i modellen å skyldes mediets innflytelse på cellens bindingsmuligheter. I de tilfeller der substratet gir sterk binding til underlaget vil den framadgående bevegelsen være jevn, med få oscillasjoner. Dersom substratet derimot gir cellen dårligere bindingsforhold, vil dens binding til underlaget være svak og dermed kunne brytes lett. Dette vil resultere i hurtig bevegelse, preget av betydelige oscillasjoner. Hvis bindingsforholdene derimot er dårlige slik at lamellipodia ikke klarer å feste seg til de midlertidige bindingssetene, vil den trekkes tilbake mot lamella. Dette skjer i en "ruffle" bevegelse der lamellipodia løftes mot den dorsale celleoverflaten før den hurtig trekkes inn mot cellen.

Cellens festeprosess til underlaget kan skje på to ulike måter. Cellen kan, dersom bindingsforholdene tilsier det, inngå en stabil binding ved å feste seg uniformt til substratum, for så å bre seg utover denne. På denne måten oppnår cellen en sterk binding til underlaget som vanskelig brytes. Dersom cellens bindingsmuligheter er dårligere, kan cellen nøye seg med feste til midlertidige bindingssteder. Disse representerer dynamiske strukturer som ved gitt stimuli løses opp og muliggjør cellebevegelse og mitose.

Mekanismen som flytter cellens tyngdepunkt, samt bakende framover er ikke kartlagt. Mogilner og Oster (2003) forslo at depolarisering av aktinnettverket kunne skape kontraherende kraft, stor nok til å løfte cellens bakdel. Dette har siden blitt understøttet da in vitro eksperimenter med nematode sperm ekstrakt, en celle som mangler cytoskjelett motorproteiner, viste samsvar med gelmodell for polarisasjon-indusert tilbaketrekning (Wolgemuth et al. 2005).

I tillegg til aktins mulige bevegelsesbidrag, tyder en rekke data på at myosin motor proteiner er sterkt medvirkende i prosessen. Myosin motor proteiner er molekyler som binder og beveger seg langs aktinfilamentene ved å utnytte energi frigitt fra den gjentakende ATP hydrolysen. Proteinene nyttiggjør denne energien til å frakte celleorganeller intracellulært og sette filamenter i bevegelse relativt til hverandre, noe som kan resultere i celledeling og muskelkontraksjoner.

Observasjoner gjort i fluorescensmikroskop viser at cellens bakre del har høy konsentrasjon av myosin, da spesielt myosin II. Påfølgende undersøkelser gjort på myosin IIA-defekte celler viser betydelig økt cellemigrering samt økte membrankontraksjoner (Even-Ram et al. 2007). Dette indikerer at myosin IIA virker negativt på cellemigreringen, dvs. bremser bevegelsen.

## **2.2 Strålingsfysikk**

Delkapitlene 2.2.1-2.2.2 baserer seg på *Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry* (Attix 2004)

### **2.2.1 Ioniserende stråling**

Ioniserende stråling er definert som stråling, enten partikulær eller elektromagnetisk, med tilstrekkelig energi til å ionisere atomer i mediet den brer seg. Energitereskelen for at en ionisasjon skal kunne inntreffe varierer fra 4-25 eV, avhengig av mediets molekyllære sammensetningen.

Ioniserende stråling deles inn i to hovedgrupper, direkte og indirekte ioniserende, basert på deres energiavsetningsmønster i mediet. Direkte ioniserende stråling består av ladde partikler og avsetter sin energi direkte i mediet ved en rekke coulombinteraksjoner.

Indirekte ioniserende stråling, som består av fotoner eller uladde partikler, avsetter energien til ladde partikler i mediet. Disse vekselvirker videre direkte med det omliggende medium slik at energien avsettes her.

### **2.2.2 Strålingens vekselvirkning med materie**

Ettersom det kun er anvendt fotonstråling i denne oppgaven, begrenser jeg presentasjonen til fotonenes energiavsetningsmønster.

Fotoner vekselvirker ved tre prosesser; fotoelektrisk effekt, comptonspredning og pardannelse, avhengig av det innkommende fotonets energi. Ettersom  $\gamma$ - og

røntgenstrålingen anvendt i denne oppgaven ligger i energiområdet der Comptonvekselvirkningene dominerer, er denne prosessen av størst interesse.

Ved comptonvekselvirkning overføres deler av det innkommende fotonets energi til et fritt elektron i materie. Det innkommende fotonet mister opptil 80% av sin energi i denne vekselvirkningen, noe som kommer til uttrykk ved redusert energi og endret bevegelsesretning (Hall og Giaccia, 2006 #10).

## 2.3 Strålingsbiologi

Delkapittel 2.3.1 og 2.3.2 gjengir kapittel 17 i *Molecular biology of the cell* (Alberts et al. 2002), og kapittel 3 og 5 i *Radiobiology for the Radiologist* (Hall og Giaccia 2006).

### 2.3.1 Cellulær strålerespons

#### Cellens strålefølsomhet gjennom syklus

Cellens strålefølsomhet varierer gjennom cellesyklus. De fleste celler har sine mest strålefølsomme perioder i G<sub>2</sub>- og M-fase, for så å være stråleresistente sent i S-fase. I G<sub>1</sub>-fasen varierer cellens strålefølsomhet, avhengig av faselengden. Dersom denne er kort vil cellens stråleresistens øke utover fasen, før den når sin mest stråleresistente periode i slutten av S-fase. Celler, viss G<sub>1</sub>-varighet er lang, opplever en stråleresistent periode tidlig i fasen før de blir mer strålefølsomme mot slutten av G<sub>1</sub>-fasen. Videre initiering av S-fase vil igjen øke cellens stråleresistens.

#### Cellens stråleskader

Cellens stråleskader deles inn i tre hovedgrupper; **letale**, **subletale** og **potensielt letale**.

Letale skader er irreversible og leder alltid til celledød.

Subletale skader er skader som under normale forhold repareres i løpet av noen timer. De er alene ikke dødelig for cellen, men kan samvirke og danne letale skader dersom de oppstår tett nok i tid og rom.

Potensielt letale skader er skader som medfører celledød dersom de ikke repareres i tide. For å fremme reparasjon av slike skader kan cellen holdes tilbake ved hjelp av p53 i G<sub>1</sub>k og ved hjelp av spesielle stråleinduserte enzymer i G<sub>2</sub>k. Dette, samt dårligere vekstforhold, gir reparasjonsmekanismene økt virketid, hvilket øker sannsynligheten for celleoverlevelse.

Av skadene påført cellen av ioniserende stråling er trådbrudd i DNA aller viktigst. Brudd i en av DNAs to tråder betegnes singeltrådbrudd (SSB). Dette representerer en subletal stråleskade, som cellen reparerer fortløpende. Brudd i begge DNA-trådene betegnes dobbelttrådbrudd (DSB). Slike brudd kan oppstå direkte eller indirekte som et resultat av flere SSB. Når to SSB skjer nær hverandre på hver sin tråd innen et gitt tidsperspektiv klarer ikke de svake kovalente bindingene mellom trådene å holde disse sammen. Dette resulterer i at DNA brytes opp og et DSB dannes. Slike brudd er svært vanskelige å



reparere og representerer en potensielt letal stråleskade, ettersom DSB i mange tilfeller medfører celledød dersom de ikke repareres før cellen når M-fase.

En celle kan dø gjennom ulike prosesser, der nekrose og apoptose er de to viktigste.

Mitotisk død, der cellene dør ved delingsforsøk, er cellens vanligste døds måte som følge av stråleskader. Her sveller cellen før den til slutt sprekker, ved en prosess kalt nekrose, slik at dens intracellulære bestanddeler lekker ut i ekstracellulærvæsken. I et vev vil dette forurense de omliggende cellenes miljø og kan resultere i en inflammatorisk respons. Mitotisk celledød trenger ikke finne sted i cellens første cellesyklusgjennomgang, den kan gjennomgå et par cellesykluser før letaliteten er et faktum.

Den andre mekanismen, apoptose, er en gunstig måte for cellen å dø på. Her separeres cellen i små membranbundne fragmenter, før den videre fagocyteres av de omliggende cellene. På denne måten resirkuleres den døde cellens bestanddeler, slik at de kommer de omliggende cellene til nytte, samtidig som den inflammatoriske responsen unngås.

Apoptose er en kreftbeskyttende mekanisme ettersom den hindrer cellen å reparere skader, hvilket kan ende med feilreparasjon. Dersom en feilreparasjon finner sted kan det første steget mot kreftutvikling være tatt ettersom feilen kan lede til irreversible skader, som kan gi varige kromosomendringer dersom skadene fikses i mitose.

### **2.3.2 Celleoverlevelseskurver**

En celleoverlevelseskurve viser andelen overlevende celler som funksjon av stråledosen. Overlevende celler (klonogene celler) defineres som celler som klarer å danne makroskopiske kolonier, dvs. kolonier inneholdende minimum 40-50 celler (Steel 1997).

Cellens overlevelsessevne avhenger av hvor i cellen energiavsetningen finner sted. For at en inaktivering skal finne sted må energiavsetningen skje i umiddelbar nærhet til cellens kritiske target, som for cellen er DNA. Hvor tett energiavsetningen skjer i cellen er dermed avgjørende for celleoverlevelsen, noe som gjenspeiles i celleoverlevelseskurven nedenfor (figur 2.5).

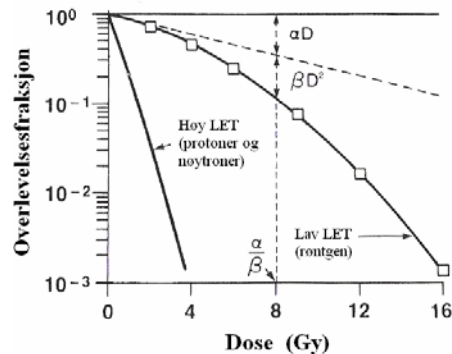
Ved tett ioniserende stråling (høy LET) ses en lineær sammenheng mellom overlevelse og dose i det semilogaritmiske plottet, som uttrykker en tilnærmet eksponensiell sammenheng. Kurven for lav-LET stråling (røntgen og  $\gamma$ -stråling) kjennetegnes av en begynnende lineær del for så å etterfølges av et skulderområde. Ved videre doseøkning rettes kurven ofte ut igjen, og vi får et tilnærmet lineært forhold mellom overlevelse og dose.

Overlevelseskurven for lav-LET stråling er forsøkt beskrevet gjennom en rekke modeller. I LQ-modellen (linear quadratic) framlagt av Sinclair (1966) foreslås cellen å ha to komponenter som bidrar henholdsvis lineært og kvadratisk til celleinaktiveringen.

Celleoverlevelsen  $S$  uttrykkes:

$$S = e^{-\alpha D - \beta D^2} \quad (2.1)$$

der  $D$  er stråledose og  $\alpha$  og  $\beta$  konstanter, som representerer henholdsvis den lineære og kvadratiske komponenten til inaktivering.



**Figur 2.5: Celleoverlevelseskurver for høy og lav LET-stråling.**

Høy-LET stråling gir eksponensielle overlevelseskurver, mens lav-LET stråling gir kontinuerlig krumning. (Hall og Giaccia, 2006, modifisert)

Videre sammenheng mellom celleoverlevelse og molekylære skader ble bekreftet av Chadwick og Leenhouts (1973) da de utledet den samme modellen under antagelse at DSB er den letale skaden som medfører celleinaktivering. Den lineære og kvadratiske komponenten antas å representere to ulike prosesser for dannelsen av slike brudd.

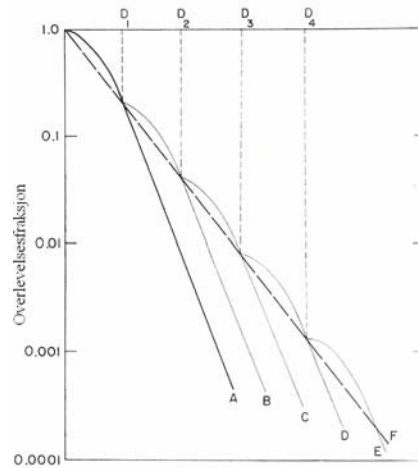
Den lineære komponenten  $\alpha$  utgjør andelen DSB som dannes ved at en stråle bryter begge trådene i DNA. Den kvadratiske komponenten  $\beta$  representerer andelen DSB som forårsakes ved at to stråler bryter hver sin tråd i DNA, for så at disse bruddene samvirker og danner DSB. De to enkelttrådbruddene (SSB) representerer her subletale skader, hvilket repareres fortløpende av cellen med en halveringstid omkring 15 minutter (Løvhaug et al. 1976). Dersom de subletale skadene skal resultere i et DSB må bruddene inntreffe nær hverandre både i tid og rom, dvs. før en av de tilførte skadene er reparert. Andelen reparerte subletale skader beregnes ved  $\alpha/\beta$ -forholdet til overlevelseskurven, hvilket angir dosen der den lineære og kvadratiske komponenten bidrar like mye til celleinaktivering:

$$\alpha D = \beta D^2 \quad (2.2)$$

Et lavt  $\alpha/\beta$ -forhold gjengir en bred skulder, noe som gjenspeiler stor grad av subletal reparasjon. Et stort  $\alpha/\beta$ -forhold, gjengir en smal skulder og dermed liten grad av reparasjon.

### 2.3.3 Fraksjonert bestråling

Ved fraksjonert bestråling gis den ønskede dosen gjennom flere mindre bestrålinger. Dette muliggjør økt reparasjon av subletale stråleskader mellom fraksjonene, hvilket gjenspeiles i celleoverlevelseskurven der skulderområdet gjentas i hver fraksjon avhengig av fraksjoneringsdosen:



**Figur 2.6: Fraksjonering**

*Ved fraksjonering gjentas skulderområdet avhengig av fraksjoneringsdosen. Dette gjenspeiles i celleoverlevelseskurven, der den økte overlevelsen kommer av at cellen gis mulighet til reparasjon av subletale skader. (Hall og Giaccia, 2006, modifisert)*

I stråleterapien anvendes fraksjonering for å maksimalisere skadevirkningen ovenfor tumorvev og samtidig spare normalvevet. Dette er mulig ettersom senresponderende vev har et mindre  $\alpha/\beta$ -forhold enn tidligresponderende vev, samt tumorvev, og dermed et bredere skulderparti. Ved økende fraksjonering vil dermed overlevelsen for normalvev relativt til tumorvev øke.

#### Doserateeffekt

Etterhvert som fraksjonene gjøres mindre, når man til slutt en grense hvor dosen gis kontinuerlig, men ved lav doserate. Når doseraten senkes, men holdes over et gitt nivå ( $\sim 1$  Gy/time), økes celleoverlevelsen som et resultat av at cellen rekker å reparere flere subletale skader før disse samvirker og induserer letale skader (Hall og Giaccia, 2006). Denne effekten kalles doserateeffekten. Dersom doseraten senkes under dette nivået opphører doserateeffekten og celleoverlevelsen reduseres (Hall og Giaccia, 2006). En slik effekt kalles invers doserate effekt, men denne blir ikke omtalt i denne oppgaven.

### 2.3.4 Hypersensitivitet og induisert stråleresistens

Eksperimenter utført de siste årene har påvist spesifikke strålesensitive doseområder for enkelte celletyper ved doser under 0.5 Gy (Joiner et al. 2001). Disse doseområdene har en nedsatt overlevelse i henhold til LQ-modellens fremstilling, og celletypene som har denne karakteristikken betegnes strålehypersensitive (HRS). Etter den hypersensitive perioden følger et doseområde der cellen viser økende stråleresistens, betegnet induisert stråleresistens (IRR). IRR intrefør i doseområdet  $\sim 0.5$ -1 Gy (Joiner et al. 2001).

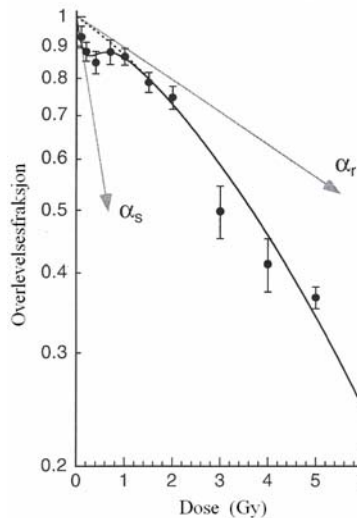
#### Modeller som beskriver HRS/IRR sin innvirkning på celleoverlevelsen:

Ettersom LQ-modellen ikke beskriver HRS/IRR, har det blitt lagt fram alternative modeller for å beskrive dette.

IR(Induced Repair)-modellen fremlagt av Joiner og Johns (1988), modifiserer LQ-modellen ved at  $\alpha$ -leddet erstattes med funksjonen:

$$\alpha = \alpha_R \left( 1 + \frac{\alpha_S}{\alpha_R} e^{-\frac{D}{D_c}} \right) \quad (2.3)$$

der  $\alpha_R$  og  $\alpha_S$  representerer den initielle helningen ved bruk av henholdsvis LQ- og IR-modellen.  $D_c$  gjenspeiler dosen som kreves for at 63% ( $1 - 1/e$ ) induisert stråleresistens inntreffer.



**Figur 2.7: Hypersensitivitet og induisert stråleresistens (HRS/IRR)**

Kurvene viser asynkrone humane gliomaceller bestrålt med 240 kV<sub>p</sub> røntgenstråling tilpasset henholdsvis LQ- (stiplet linje) og IR-modellen (heltrukken linje)(Joiner et al. 2001,modifisert).

Generelt avviker LQ- og IR-modellen noe fra eksperimentielle data ved høye stråledoser ettersom kurven ikke flater ut slik data viser, men fortsetter krumningen. I doseområdet relevant for stråleterapi gjengis imidlertid data godt, noe som gjør LQ-modellen aktuell i klinikken.

### **Mulige mekanismer bak HRS/IRR**

De molekylære mekanismene bak HRS/IRR er per dags dato ikke kartlagt, men flere observasjoner knytter fenomenene til spesifikke hendelser, som reparasjon av DNA-skader, apoptose og induksjon av et stråleindusert G<sub>2</sub>/M-kontrollpunkt i G<sub>2</sub>-fase.

Det var tidligere antatt at en kun hadde ett G<sub>2</sub>/M-kontrollpunkt. Dette konvensjonelle kontrollpunktet ble aktivert når cellene nådde G<sub>2</sub>-fasen etter å ha blitt bestrålt i G<sub>1</sub>- eller S-fase og resulterte i celleakkumulering i G<sub>2</sub>. Senere oppdagelse av et tidlig, transient G<sub>2</sub>/M-kontrollpunkt, i tillegg til det konvensjonelle G<sub>2</sub>/M-kontrollpunktet, har gitt oss ny innsikt i prosessene som resulterer i HRS (Xu et al. 2002). I motsetning til det konvensjonelle G<sub>2</sub>/M-kontrollpunktet som arresterer celler bestrålt i G<sub>1</sub>- og S-fase, arresterer det såkalt ATM-avhengige, transiente G<sub>2</sub>/M-kontrollpunktet celler bestrålt i G<sub>2</sub>. Kontrollpunktet aktiveres umiddelbart etter bestråling dersom dosen overskrider 0.4 Gy, og forblir aktivt inntil 2 timer (Marples et al. 2003).

Ettersom kontrollpunktet er inaktivt i samme doseområde som HRS uttrykkes (< 0.4 Gy) ledet dette til hypotese om at HRS gjenspeiler manglende G<sub>2</sub>-arrest hos stråleskadede G<sub>2</sub>-celler, slik at disse entrer mitose med skader (Marples et al. 2003; 2004). Senere studier har støttet en slik sammenheng.

Cellens strålefølsomhet etter eksponering for stråling med doser under 1 Gy varierer mellom de ulike cellesyklusfasene, der G<sub>2</sub>-celler viser klart størst HRS, mens G<sub>1</sub>- og S-celler viser henholdsvis liten og ingen grad av HRS (Skwarchusk et al. 1993; Marples et al. 2003; Short et al. 2003). Variasjonen i HRS kan ikke forklares ut fra cellenes sensitivitetsvariasjon gjennom syklus, dette ettersom HRS er observert i synkroniserte, så vel som usynkroniserte cellepopulasjoner (Wouters og Skarsgard, 1997; Lambin et al. 1996). Eksperimenter med HRS-uttrykkende celler har vist at andelen celler i M-fase synker drastisk etter bestråling med 0.3 Gy, i kontrast til celler som ikke uttrykker HRS, der man ser et mer linært forhold mellom dosen og antall celler i M-fase (Marples et al. 2003).

Sammenheng mellom HRS og p53-avhengig apoptose har blitt påvist (Enns et al. 2004; Krueger et al. 2007), og observasjoner av Krueger et al. viser økt grad av apoptose hos hypersensitive G<sub>2</sub>-celler bestrålt med doser under 0.3 Gy. Ved å øke andelen G<sub>1</sub>-celler, og på den måten redusere andelen G<sub>2</sub>-celler i cellesyklus, bortfalt økningen i apoptose. Denne, samt de tidligere nevnte observasjonene, støtter hypotesen om at HRS gjenspeiler manglende G<sub>2</sub>-arrest etter stråledoser i området under ca. 0.3 Gy (Marples et al. 2003; 2004), og fremmer teori om at de skadede G<sub>2</sub>-cellene som entrer M-fase går i apoptose (Krueger et al. 2007).

Hvorvidt organismen er tjent med HRS er ikke kartlagt, men det kan isåfall være to grunner til dette (Marples et al. 2004). HRS kan enten hindre overlevelse av skadede celler eller hindre at cellene utsettes for feilreparasjon, hvilket kan gi uheldige utfall for organismen.

Ved økende stråledose øker andelen skadede celler og det kan da være hensiktsmessig for organismen og la cellene overleve ved å gjennomgå reparasjon, trass økt risiko for kreftutvikling som følge av feilreparasjon. Som følge av de økende cellulære skadene aktiveres DNA-reparasjonsmekanismene og resulterer i IRR-respons. IRR sin avhengighet av proteinsyntese er bekreftet ved ulike undersøkelser, der celler eksponert for DNA-reparasjon-proteintranskripsjonshemmende stoffer, ikke uttrykker IRR (Marples og Joiner, 1995; 2000).

### **2.3.5 Adaptiv effekt**

Adaptiv effekt er et fenomen hvor en celle, etter eksponering for kjemikalier eller en prebestråling ( $< 1$  Gy), utvikler resistens mot en etterfølgende større stråledose. Den adaptive effekten avhenger av doseraten, uttrykkstiden, kulturforholdene og cellesyklusfasen (Cregan et al. 1999).

Adaptiv effekt ble i utgangspunktet beregnet ved å registrere antall kromosomaberasjoner etter bestråling, men har i senere tid også blitt målt ved kolonioverlevelse etter bestråling.

Røntgenbestråling av humane lymfocytter utført av Shadley og Wiencke (1989) viste at effekten av primingdosen (andelen kromosomskader) varierer med dosens størrelse og doserate. I de tilfeller hvor primingdosen var 0.01 Gy ble den adaptive responsen kun indusert ved høy doserate 12 Gy/time og ikke ved lav doserate 0.3 Gy/time. Når primingdosen derimot var 0.5 Gy ble den adaptive responsen kun indusert ved lave (0.3 og 0.6 Gy/time) og ikke ved høye doserater (6, 12 og 30 Gy/time). Eksperimenter av Feinendegen et al. (1999) med 6 ulike cellelinjer viste at den adaptive responsen ble fullstendig indusert ved primingdoser i området 0.01 til 0.2 Gy, delvis indusert for primingdoser over 0.2 Gy, og ikke indusert ved doser overskridende 0.5 Gy, ved lav LET-stråling. Disse resultatene tyder på at det finnes en optimal primingdose og primingdoserate avhengig av den gitte celletypen.

Tidsrommet mellom primingdosen og effektdosen spiller også en vesentlig rolle for å oppnå den adaptive effekten. Eksperimenter med humane lymfocytter, der en måler andelen kromosomskader, har vist at det er nødvendig med 4 timer mellom dosene for å oppnå adaptiv effekt, og at denne varer opp til 66 timer (Shadley et al. 1987). Senere studier med T-47D-celler har vist at det for T-47D er tilstrekkelig med en time mellom dosene for å oppnå den beskyttende effekten og at denne varer i over 24 timer (Raaphorst og Boyden, 1999). Den adaptive effekten kan også gi beskyttelse dersom to små stråledoser gis etter hverandre.

### **2.3.6 Indusert bortfall av HRS**

Bortfall av HRS, fra nå av betegnet indusert bortfall av HRS, i hypersensitive cellelinjer er vist som følge av en lav primingdose gitt ved henholdvis LDR og HDR etterfulgt av lave effektdoser (Marples og Joiner, 1995; Joiner et al. 1996; Wouters og Skarsgard, 1997; Short et al. 2001; Edin et al. 2007). Gjenvinning av HRS for de gitte cellelinjene er vist avhengig av celletypen (Short et al. 2001) og primingdoseraten (Edin et al. 2007). Undersøkelser av Short et al. (2001) viste at HRS hos alle celletypene primet ved HDR hadde returnert innen en cellesyklusgjennomgang, mens lignende studier med 0.3 Gy LDR-primede T-47D-celler viste at HRS forblir fjernet over lengre perioder (> 14 måneder), muligens permanent (Edin et al. 2008). En hypotese fremlagt av Edin et al. (2007) foreslår at LDR-priming gjør det ATM-avhengige G<sub>2</sub>/M-sjekkpunktet tilgjengelig permanent, slik at cellene arresteres selv ved stråledoser under 0.4 Gy.

## 3 Materialer og metoder

### 3.1 Cellelinjen

En etablert cellelinje er en populasjon celler som er i stand til å dele seg i det uendelige i kultur som følge av en genetisk endring (Alberts et al. 2002).

I denne oppgaven ble det benyttet celler fra den etablerte cellelinjen T-47D. Cellelinjen ble isolert i november 1974 fra pleuraeffisjonsvæske hos en pasient med brystcarcinom (Keydar et al. 1979). T-47D-cellene har epitelmorfologi og danner monolag i kultur. Cellene har normal RB funksjon (Åmellem et al. 1998, Stokke et al. 1993), men defekt p53 funksjon som følge av en mutasjon i p53-genet (Casey et al. 1991).

Doblingstidene til T-47D-cellene anvendt i denne oppgaven ble bestemt ved filmobservasjon til omtrent 30 timer.

I foreliggende oppgave har jeg undersøkt celleoverlevelsen til T-47D-celler etter priming og effektbestråling ved hjelp av "time-lapse" film. Fire ulike cellepopulasjoner ble filmet og disse har fått følgende betegnelser:

- **T-47D-celler**  
Villtypen, dvs. ubestrålte T-47D-celler. Denne og videre nevnte cellepopulasjoner ble dyrket i kultur.
- **T-47D-celler + 0.3 Gy**  
Uprimede T-47D-celler bestrålt med røntgenstråling ved BMF-gruppen ved Fysisk Institutt, UiO. Doseraten var 30 Gy/time (HDR) og dosen 0.3 Gy. Det ble brukt 0.5mm kobberfilter til skjerming.
- **T-47D-P-celler**  
T-47D-celler primet med [ $^{60}\text{Co}$ ]- $\gamma$ -stråling ved Det Norske Radiumhospital 17.08.2005 av Edin. Doseraten var 0.3 Gy/time og dosen var 0.3 Gy. Det ble brukt 8 cm Ros-metall til skjerming.
- **T-47D-P-celler + 0.3 Gy**  
[ $^{60}\text{Co}$ ]- $\gamma$ -primede celler gitt samme bestråling som de cellene som betegnes "T-47D-celler + 0.3 Gy".



## 3.2 Celledyrking

Arbeidet med denne oppgaven ble utført ved celledlaboratoriet ved BMF-gruppen ved Fysisk institutt, UiO.

### 3.2.1 Utstyr/kjemikalier og sterile rutiner

For å sikre cellene sterilt miljø ble alt utstyr som kom i kontakt med cellene sterilisert før bruk, i tillegg til at alt arbeidet hvor cellene eller løsningene kom i kontakt med luft utført i en LAF-benk (LAF = Laminær Flow). Benyttet LAF-benk var av typen OAS LAF VB 2040 (Simonsen AS, Oslo) og for å sikre sterilitet ble benkeplaten desinfisert med 70% etanol. Alt utstyr som kom i kontakt med cellene og løsningene, med unntak av de sterile engangspipettene som ble kastet etter bruk, ble vasket og sterilisert på celledlaboratoriet ved UiO. Dette utstyret ble vasket i såpevann (Decon 90, Decon Laboratories Limited, England) og skylt 24 timer i springvann, før glass og metallutstyr ble pakket i aluminiumsfolie og tørrsterilisert i en termaks varmeovn (Termaks, Bergen) ved 180°C i omlag 3 timer. Gummi- og tøyutstyr ble pakket i autoklavposer og autoklavert (Webco) ved 120°C i 25 minutter. Glassutstyr som flaskekorker, samt gummikorker ble brent med en gassflamme like før bruk.

Vekstmediumet cellene ble dyrket i var av typen RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 vekstmedium, tilsatt 10% føtalt kalveserum, 1% penicillin (5000 IU/ml), 1% L-glutamin og 0.2% insulin for å sikre optimale vekstforhold. Mediet inneholder de næringsstoffene, vitaminene og uorganiske saltene cellene trenger, mens kalveserum og insulin tilfører vekstfaktorer nødvendige for proliferasjon. Aminosyren L-glutamin nedbrytes relativt raskt, og ny L-glutamin tilsettes derfor mediet hver uke. Penicillin og streptomycin er antibiotika som skal forhindre bakterieoppvekst i mediet.

Trypsin er et proteolytisk enzym som løsner cellene fra underlaget de er festet til ved å bryte proteinbindinger mellom naboceller og enkeltcellens feste til underlaget. EDTAen tilsatt trypsinen hjelper til å løse opp båndene mellom cellene, ved at den binder seg til  $\text{Ca}^{2+}$  som cellene er avhengige av for å kunne opprettholde intracellulære bindinger.

Trypsin og vekstmedium ble laget ved laboratoriet og sterilisert ved filtrering (Millex-GP<sub>50</sub> filter, porestørrelse 0.22µm, Millipore AS, Irland). Løsningene ble oppbevart i kjøleskap og varmet til 37°C i vannbad før bruk.

Cellene i oppgaven ble dyrket i sterile 25cm<sup>2</sup> plastflasker (Nunc, Danmark) og oppbevart med åpne korker i en semisteril CO<sub>2</sub>-inkubator (National Heinicke Company) som sikret stabil temperatur (37°C), fuktighet (95%) og CO<sub>2</sub>-nivå (5%).

Alle kjemikalier og oppskrifter benyttet i denne oppgaven er oppgitt i vedlegg A og B.

### 3.2.2 Celleomsetting

Prolifererende celler trenger jevnlig tilførsel av vekstfaktorer og næringsstoffer, samtidig som cellulære avfallsstoffer må fjernes fra cellens omgivelser. For å sikre optimal proliferasjon er det viktig å kontrollere celletettheten i flaskene, ettersom både for høy og

for lav celletetthet hemmer celleveksten. Som følge av dette blir cellene omsatt to ganger i uken, hver mandag og fredag, og vekstmediumet skiftet hver onsdag.

### **Omsetting**

Ved utsåing ble det gamle vekstmediet fjernet, før cellene ble skylt to ganger med trypsin. Celleflasken, som da lå fuktet i trypsin, ble videre inkubert ved 37°C i noen minutter til cellene hadde løsnet fra underlaget. Etter at cellene hadde løsnet fra underlaget ble vekstmedium tilsatt for å oppheve trypsinets virkning. Celleløsningen ble deretter pumpet forsiktig med en pipette for å separere cellene, hvilket ble kontrollert i mikroskop (Nikon TMS, Japan). Ønsket mengde celleløsningen ble videre tilsatt til en ny celleflaske med vekstmedium, før flasken ble flushet med luft inneholdende 5% CO<sub>2</sub> for å sikre optimal pH. Celleflaskene ble forsegle og overført til et inkubatorskap der de ble oppbevart mellom omsetningene.

### **Mediumskift**

Ved mediumskift ble gammelt medium fjernet og nytt vekstmedium tilsatt, før flasken ble flushet med luft med 5% CO<sub>2</sub>.

## **3.3 Bestråling**

I denne oppgaven benyttes ioniserende elektromagnetisk stråling, da nærmere bestemt røntgen- og  $\gamma$ -stråling. Begge stråletypene er fotonstråling, men skilles grunnet ulikt opphav og enkeltfotonenes energifordeling.

Primingdosen ble gitt til T-47D-cellene den 17.08.2005 av Edin ved Det Norske Radiumhospita med [<sup>60</sup>Co]- $\gamma$ -stråling. Doseraten var 0.3 Gy/time og dosen var 0.3 Gy. Det ble brukt 8 cm Ros-metall til skjerming. Disse cellene har blitt dyrket kontinuerlig siden, kun avbrutt av en 2-ukers periode nedfrosset i flytende nitrogen, og benevnes nå T-47D-P-celler.

Cobolt-60 desintegrerer ved beta-desintegrasjon til den stabile isotopen [<sup>60</sup>Ni], under utsendelse av et elektron med energi opp til 320 keV (Kiefer, 1990 #16) og to fotoner med energi henholdsvis 1.17 MeV og 1.33 MeV.

Effektbestrålingene ble utført ved BMF-gruppen ved Fysisk Institutt, UiO med røntgenstråling. Røntgenkilden (Pantak HF225) var innstilt på 220 kV og 10 mA. Dosen var 0.3 Gy for filmforsøk og 0.1-2 Gy ved koloniforsøk.

Under bestrålingen var celleflaskene plassert i et 37°C forvarmet stålkammer med en indre diameter på 25.5 cm, dekket av et stållukk med 1 mm tykkelse. For å sikre stabil temperatur ved lengre bestrålinger ble kammeret plassert på en varmeplate tilkoblet et forvarmet vannbad (Ecoline, Lauda, Tyskland). Før strålingen nådde frem til kammeret ble den filtrert ved et 0.5 mm kobberfilter. Doseraten for oppsettet er bestemt til 30 Gy/time av Eirik Malinen ved hjelp av alanindosimetri.

### **3.4 Filmforsøk**

Filmeksperimentene ble utført i inkubatorrommet ved BMF-gruppen ved Fysisk Institutt, UiO, hvor temperaturen holdes konstant på 37°C.

#### **3.4.1 Utsåing**

Ved filmforsøkene ble det sådd ut 30000-50000 celler per flaske avhengig av ønsket celletetthet etter prosedyre beskrevet i kapittel 3.2.2, s.27. Cellene ble separert ved at celleløsningen ble pumpet forsiktig ved bruk av en pipette. Det ble ikke brukt kanyler, som ved koloniforsøk (kapittel 3.5.1, side 26), ettersom det var ønskelig å undersøke overlevelsen og andelen cellulære effekter på både enkeltceller, dubletter og tripletter.

For å sikre at ønsket antall celler ble sådd ut, ble suspensjonens konsentrasjon av celler målt ved hjelp av et Bürkerkammer, før suspensjonen ble fortynnet til ønsket celletetthet. Multiplisiteten ble beregnet til 1.367, ved ligning 3.7 (s.36), der gjennomsnittlige antall enkeltceller, dubletter og tripletter ved filmstart i tabell 4.3 og 4.4 (s.45-46) ble benyttet til utregningen.

T-47D-cellene trenger minst 5 timer på å feste seg til underlaget og ble av denne grunn oppbevart minimum 5 timer med åpne korker i en CO<sub>2</sub>-inkubator i etterkant av utsåingen.

#### **3.4.2 Effektdosebetråling med røntgenstråling**

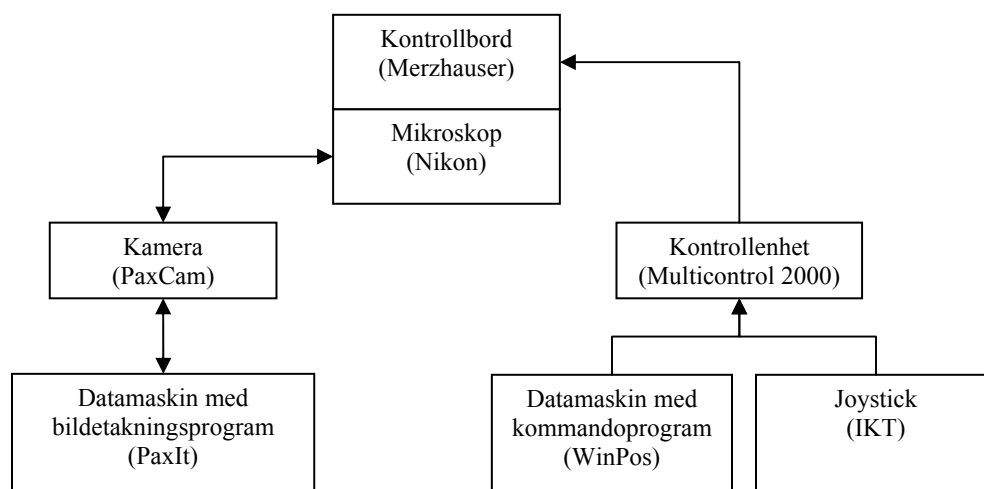
Ved "time-lapse" filming ble bestrålingen av cellene utført umiddelbart før filmstart. Ettersom T-47D-celler viser størst grad av hypersensitivitet ved 0.3 Gy (Edin upublisert, personlig meddelelse), ble denne dosen brukt for å undersøke hypersensitivitetsfenomenet. Siden bestrålingstiden med røntgenstråling kun var 36 sekunder (HDR), kan det antas at cellene holder ~ 37°C i oppvarmede stålkamre under bestrålingen. Temperaturkontroll ble derfor ikke benyttet ved filmforsøk.

Celleflaskene ble, med unntak av når de oppholdt seg i CO<sub>2</sub>-inkubatoren, forseglest for å hindre kontaminering og sikre stabilt CO<sub>2</sub>-nivå.

#### **3.4.3 Bildeopptak ved "time-lapse" filming**

For bildeopptak ble celleflaskene plassert på et mikroskop (Nikon) med motorisert kryssbord (Merzhauser), som kan beveges ved hjelp av en joystick (IKT) eller et kommandoprogram (WinPos) ved at disse gir kommandoer via en kontrollenhet (Multicontrol 2000, IKT). Bildetakningen ble gjort av et kamera (PaxCam) tilkoblet mikroskopet, som ble styrt av et bildeprogram (PaxIt) på datamaskinen.

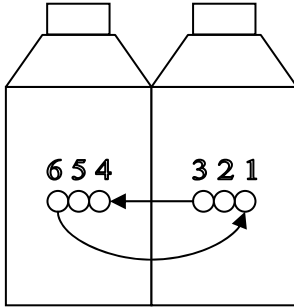
For å hindre eventuelle uoverensstemmelser mellom kommando- og bildebehandlingsprogram ble disse kjørt fra to separate datamaskiner.



**Figur 3.1: Oppsett for filmforsøk inne på inkubatorrommet**

*Bildetakningen skjer ved at et kamera tilkoblet mikroskopet gis kommandoer fra et bildetakningsprogram, for så at bildedata lagres på datamaskinen. Kryssbordet beveges ved hjelp av en joystick eller et kommandoprogram, som gir kommandoer om ønsket kryssbordbevegelse via en kontrollenhet.*

Bildetakningen ble gjort ved at 6 utvalgte posisjoner med passende celletetthet innenfor mikroskopets synsfelt, fordelt på to celleflasker ble avbildet. Dette forgikk ved at det ble programmert et bevegelsesforløp for kryssbordet ved hjelp av kommandoprogrammet, der hver posisjon ble holdt 100 sekunder før kryssbordet forflyttet seg til neste posisjon. Kameraet ble satt til å ta bilde hvert 30. sekund ved hjelp av bildeprogrammet, og tok dermed 3 bilder per posisjon. Som følge av denne sekvensen ble de ulike posisjonene dokumentert med nye bilder hvert 30. minutt.



**Figur 3.2: Kryssbordets bevegelsesforløp**

Kryssbordet beveger seg mellom seks ulike posisjoner, derav 3 i hver flaske, som hver holdes i 100 sekunder. Hele sekvensen varer 30 minutter, og repeteres gjennom hele forsøket.

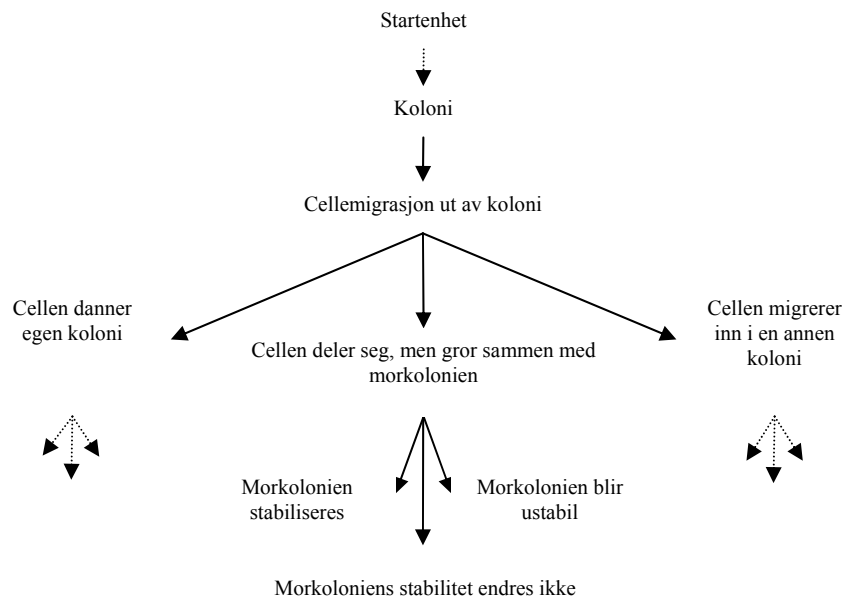
Bildetakningen varte 7 dager, der filmene ble startet og avsluttet hver mandag, og mediet skiftet hver torsdag. Ved mediumskift ble filmen stoppet en kort periode, før celleflaskenes bildeopptaksposisjoner ble gjeninntatt og filmen gjenstartet.

### 3.4.4 Filmobservasjon og overlevelsesanalyse

Etter endt bildetakning ble bildene sortert etter posisjon og det ble laget "time-lapse" film av disse ved hjelp av et filmprogram (Windows Movie Maker). Cellenes vekstmønster ble analysert ut fra filmene ved å følge hver enkelt celledens utvikling mot koloni. Observasjonene ble registrert i observasjonsskjemaer laget i dataprogrammet excel.

Observasjonsskjemaene ble utarbeidet på bakgrunn av filmobservasjon, der vi registrerte alle ulike typer observerte hendelser. Dette ble gjort ved å registrere hvilken skjebne en startcelle kunne få etterhvert som den utviklet seg gjennom de 7 dager bildeopptaket varte. Observasjonene ble inndelt i dublettdeling (definert i figur 4.5, s.49), kolonideling (definert i figur 4.6, s.50), cellemigrasjon (definert i figur 4.7, s.52), celledensammenvekst og celledensrivelse fra substratum. Disse observasjonene ble igjen delt inn i underkategorier basert på alternative videre hendelsesforløp for cellen/kolonien, samt stabilitetsendringer som følge av hvert alternative forløp.

Et fenomen kalt cellemigrasjon gir et godt eksempel på en slik kategorisering (figur 3.3). Cellemigrasjon er i denne oppgaven definert som en enkeltcelle som migrerer inn eller ut fra en koloni. Den migrerende cellen kan videre følge et av mange alternative forløp, som å danne sin egen koloni, gro sammen med morkolonien, migrere til andre kolonier eller eventuelt ut av bildet. Selve cellemigrasjonen vil her utgjøre hovedkategorien, mens alle hendelsesalternativene som følge av dette, samt hvorvidt hendelsen virker stabiliserende på kolonien eller ikke, danner grunnlaget for hver sin underkategori. Antall cellemigrasjoner blir i observasjonsskjemaet tallfestet for hver koloni. Koloniens opphav gjøres også kjent i skjemaet slik at hver enkelt hendelse kan føres tilbake til aktuell startenhet.



**Figur: 3.3: Observasjonsmodell for cellemigrasjon**

Figuren viser observasjonsoppsett for cellemigrasjon, inkludert videre alternative forløp for den migrerende cellen. Skjemaet er konstruert slik at hver enkelt migrasjon kan føres tilbake til aktuell startenheter (dvs. enkeltceller eller dubletter, tripleretter osv.). Avbildet skjemaoppsett er kortet ned og forenklet i forhold til reelt observasjonsskjema (vedlegg D)

Studier av Edin et al. (2007) har vist at HRS hos T-47D-celler oppheves dersom en 0.3 Gy HDR-effektdose gis etter en 0.3 Gy LDR-priming og at overlevelsen blir høyere enn hos kontrollcellene. Et av formålene med foreliggende oppgave er å kartlegge hvorvidt eventuelle endringer i cellens vekstmønster som funksjon av priming og effektbestråling kan forklare en slik forhøyet celleoverlevelse. Gjennom filmobservasjon har det blitt kartlagt hendelser som kan påvirke koloniantallet i positiv og negativ retning. For å tallfeste eventuelle forskjeller i hendelsesforløp som funksjon av priming og effektbestråling ble det satt opp fraksjonsskjemaer der hendelseshyppigheten for undersøkt hendelse ble beregnet i forhold til antall startenheter. Dette ble gjort ved å dividere antall ganger ønsket hendelse inntraff, med antall startenheter tilhørende det gitte forsøket. Gjennomsnittlig hendelseshyppighet ble videre kalkulert ved å ta snittet av hendelseshyppighetene til hvert forsøk.

Overlevelsen som funksjon av priming og effektbestråling ble kalkulert ved å ta forholdet mellom antall levedyktige kolonier ved filmslutt,  $t = 7$  dager, og antall startenheter ved filmstart,  $t = 0$ . Overlevelsen ble korrigert for multiplisitet hos celler som mottok effektdose, der overlevelsen var under 1.

Fraksjonsskjemaene og videre analyse av disse vil presenteres i henholdsvis kapittel 4: Resultater og kapittel 5: Diskusjon. Fullstendige observasjonsskjemaer for hvert forsøk, samt kalkuleringskjema tilhørende fraksjonsskjemaene er gjengitt i vedlegg D.

### 3.4.5 Signifikanstest

I denne oppgaven er all statistisk analyse basert på forutsetningen at de stokastiske variablene ( $X$ ) er normalfordelte. Dette representerer nok en kun en tilnærming i våre målinger som kan ha andre fordelinger i noen tilfeller. Siden en mer eksakt bestemmelse av fordelingene er vanskelig med et begrenset antall observasjoner anser vi likevel at normalfordeling er en akseptabel tilnærming. For å fastslå eventuell signifikant forskjell i overlevelse/hendelseshyppighet som funksjon av priming og effektbestråling ble tosidig student t-test benyttet.

En tosidig student t-test avgjør mulig signifikant forskjell mellom to ulike sett målinger  $X_1$  og  $X_2$ :

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{s_f \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad 3.1$$

hvor  $t$  representerer sannsynligheten (fraksjonelt) for å forkaste riktig hypotese

$$s_f = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}} \quad 3.2$$

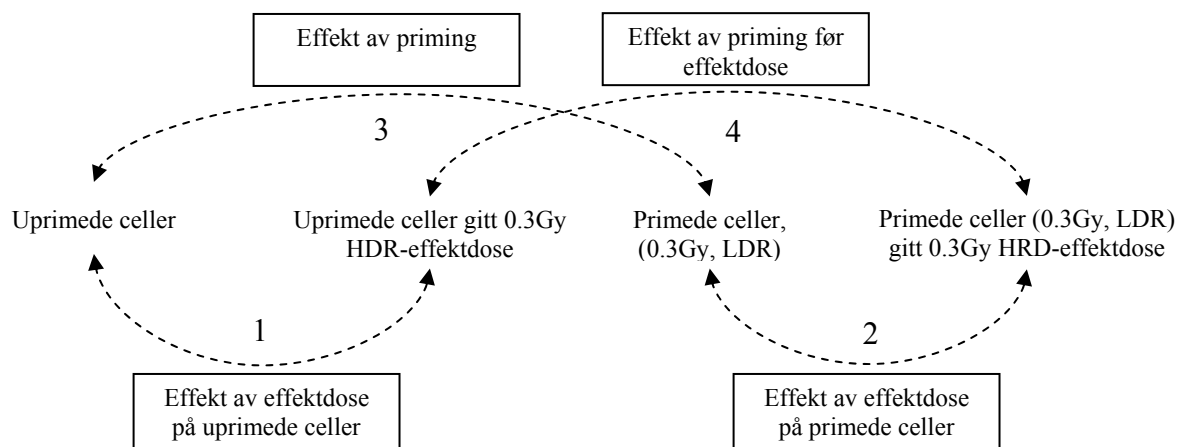
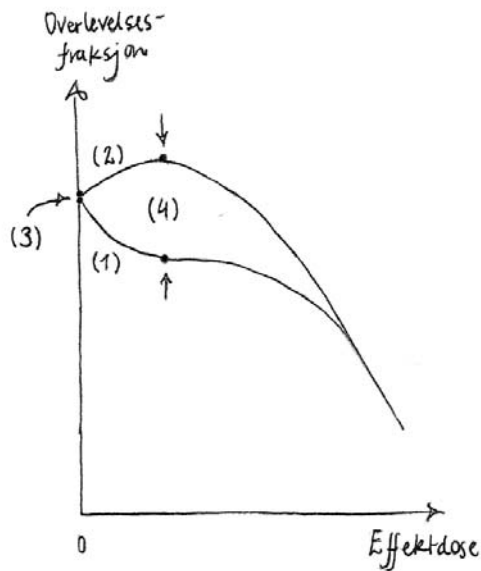
Der  $n_1$  og  $n_2$  representerer antall målinger i henholdsvis  $X_1$  og  $X_2$ ,  $s_1^2$  og  $s_2^2$  variansen for de respektive gruppene,  $s_f$  et felles standardavvik for gruppene,  $(n_1 - 1)$  og  $(n_2 - 1)$  antall frihetsgrader og  $(n_1 + n_2 - 2)$  totalt antall frihetsgrader.

Nullhypotesen,  $H_0$ , antar at middelverdiene for målingssettene vi ønsker og teste mot hverandre er like, dvs. at de gjengir samme celleoverlevelse eller samme andel cellulære hendelser. Dersom sannsynligheten for å forkaste en hypotese som er sann er under 0.05, er det konvensjon å si at hypotesen er signifikant holdbar.

En forutsetning for en slik test er at målesettene  $X_1$  og  $X_2$  er normalfordelte. Dette vil ikke være tilfelle i våre målinger, men i mangel på bedre alternativer, har vi valgt å utføre testen allikevel, vel vitende at dette kan gi noe feil.

#### Representasjon av t-test i filmforsøk

I foreliggende oppgave benyttes t-test til å slå fast eventuell signifikant forskjell i cellulær respons som følge av priming og effektbestråling. P-verdiene fra t-testene blir presentert etter mal beskrevet i figur 3.4, der de fire midtalternativene gjengir de ulike cellepopulasjonene, pilene hvilke cellepopulasjoner som testes mot hverandre, og boksene hvilke celleresponser (p-verdier) som testes mot hverandre.



Hypotese:	P-verdi
(1) Gir effektdosen en effekt på uprimede celler?	
(2) Gir effektdosen en effekt på primede celler?	
(3) Gir primingen endring i "plating efficiency" (eller andre responser)?	
(4) Induserer priming bortfall av HRS (eller andre responser)?	

**Figur 3.4: Oppsettmal og tabelloppsett for presentasjon av hypotesene testet ved t-test**

Figuren viser 4 piler (1-4) som gjenspeiler de ulike hypotesene som ble testet som funksjon av priming og effektdose. Boksene representerer hypotesene testet, mens pilene viser hvilke cellepopulasjoner som ble sammenlignet for å undersøke disse. Tabellen gjengir hvordan p-verdier fra signifikanstesten gjengis i teksten.



## 3.5 Koloniforsøk

### 3.5.1 Utsåing

Ved koloniforsøkene ble det utsådd 5 parallelle flasker per stråledose og 10 parallelle kontrollflasker, inneholdende 200 celler per flaske etter prosedyre beskrevet i 3.2.2 Celleomsetting (s.26) Det ble brukt en 2 mm kanyle, istedenfor en pipette til å separere cellene, grunnet ønsket om optimal celleseparasjon. Bürkerkammer ble her også benyttet for å sikre nøyaktig utsådd celleantall. Etter utsåingen ble celleflaskene oppbevart i en CO<sub>2</sub>-inkubator med åpne korker.

### 3.5.2 Bestråling

Ved koloniforsøkene ble cellene bestrålt 16-20 timer etter utsåing. Celleflaskene ble forseglet og plassert i en LAF-benk på inkubatorrommet for så å bli bestrålt etter tur med økende dose opp til 2 Gy. Ettersom bestrålingstidene ble opptil 4 minutter ble varmeplaten benyttet for å sikre cellene stabil temperatur på 37°C under bestråling.

Etter endt bestråling ble cellene fraktet tilbake til CO<sub>2</sub>-inkubatoren og korkene åpnet.

### 3.5.3 Inkubering og fiksering

Etter bestrålingen ble cellene oppbevart i CO<sub>2</sub>-inkubatoren i ca. 15 dager, og de fikk i løpet av denne tiden mediumskift 1-2 ganger. Cellene ble fiksert når koloniene var store nok og dermed godt synlige med det blotte øyet, ved at de ble skylt 2 ganger med PBS før de ble fiksert i ren etanol i omtrent 5 minutter. Videre ble cellene farget med metylenblått i ca. 5 minutter før de ble skylt med lunket vann og satt til tørk.

Ved kolonitellingen ble alle klonogene kolonier, dvs. kolonier inneholdene flere enn 50 celler, telt i en koloniteller med lupe (Gerber Instrument). Ved kolonier med celleantall nær 50 celler ble mikroskop (Nikon) benyttet for å avgjøre antall celler i kolonien.

## 3.6 Celleoverlevelse koloniforsøk

### 3.6.1 Overlevelsesfraksjon

For å sikre et statistisk grunnlag ble 5 flasker sådd ut og bestrålt per stråledose. Gjennomsnittlig antall kolonier  $N$  per flaske ble så beregnet, ved å telle antall kolonier i de ulike flaskene. I tillegg til de bestrålte flaskene ble det sådd ut celler på 10 ubestrålte kontrollflasker for å beregne ”plating efficiency”, ”PE”, dvs. fraksjonen av antall utsådde celler som danner kolonier:

$$PE = \frac{N(K)}{N_0(K)} \quad (3.3)$$

der  $N(K)$  er gjennomsnittlig antall kolonier i kontrollflaskene og  $N_0(K)$  er antall utsådde kontrollceller.

Overlevelsesfraksjonen,  $F$ , for flaskegruppen gitt samme dose er definert som:

$$F = \frac{N(D)}{N_0(D) \cdot PE} \quad (3.4)$$

der  $N(D)$  er gjennomsnittlig antall kolonier for gruppen gitt dose  $D$  og  $N_0(D)$  er antall utsådde celler til denne gruppen.

”Standard error” for middelveiden er gitt ved:

$$\Delta N(D) = \sqrt{\frac{1}{n(n-1)} \sum_{i=1}^n (X_i - X_m)^2} \quad (3.5)$$

der  $n$  er antall flasker per gruppe,  $X_i$  er antall kolonier i flaske  $i$  og  $X_m$  er gjennomsnittlig antall kolonier i gruppen  $m$ .

Overlevelsesfraksjonen  $F(D)$  er en funksjon av variablene  $N(D)$  og  $N_0(D)$ , og standardavviket for overlevelsesfraksjonen er gitt som:

$$\begin{aligned} \Delta F &= \sqrt{\left( \left( \frac{\partial F}{\partial N_0(D)} \Delta N_0(D) \right)^2 + \left( \frac{\partial F}{\partial N(D)} \Delta N(D) \right)^2 \right)} \\ &= \sqrt{\left( \left( \frac{-N(D)}{N_0(D)^2} \Delta N_0(D) \right)^2 + \left( \frac{1}{N_0(D)} \Delta N(D) \right)^2 \right)} \end{aligned} \quad (3.6)$$

### 3.6.2 Multiplisitetsskorreksjon

Ved utsåing må cellenes omgang med trypsin begrenses noe for å unngå cellulære skader, noe som medfører at enkelte av de kolonidannede enhetene består av to eller flere celler. I tillegg må vi ta hensyn til eventuell celledeling som har funnet sted mellom utsåing og bestråling, samt at celler ved utsåing kan ha festet seg så nær hverandre at de bidrar til å danne en koloni.

Multicellede enheter vil ha større sjanse til å danne koloni ettersom alle cellene i enheten må inaktiveres for å hindre kolonidannelse. For å korrigere for dette ble en ekstra celleflaske sådd ut ved hvert eksperiment og fiksert parallelt med bestrålingen. De kolonidannede enhetene som var enkeltceller, dubletter, tripletter etc. ble telt i

mikroskop, og flaskens multiplisitet, dvs. gjennomsnittlig antall celler i en de kolonidannende enhetene, ble beregnet:

$$M = \sum_{i=1}^m x_i \cdot i \quad (3.7)$$

der  $x_i$  er fraksjonen av cellenhetene som inneholder  $i$  celler.

Ved utregning av Edin (2003) vises den den overlevende cellefraksjonen  $f$  lik:

$$f = \frac{M - \sqrt{M^2 - 4(M-1)F}}{2(M-1)} \quad (3.8)$$

Ligning 3.6 ble benyttet selv om det i eksperimentene fantes kolonidannede enheter med mer enn to celler. Avvikene som følge av en slik tilnærming har blitt beregnet av Lorentzen (2001) for kolonidannede enheter inneholdende opp til 3 celler og funnet mindre enn 1%. Som følge av god overenstemmelse mellom eksakt og tilnærmet løsning, vil de tilnærmede løsningene benyttes ved presentasjon av resultatene i oppgaven.

### **Korreksjon ved overlevelsfraksjoner over 1**

Ved overlevelsfraksjon over 1 vil det si at vi har flere overlevende celler i de bestrålte flaskene enn i kontrollflaskene. En har tidligere trodd dette var en umulighet, men senere undersøkelser har støttet en slik forhøyet overlevelsfraksjon (Edin 2003; Christiansen 2005).

Overlevelsfraksjoner over 1 skaper problemer ved multiplisitetskorrigering, ettersom anvendt korreksjonsmodell ikke er laget for å behandle slike data. Forhøyet overlevelse, spesielt i kombinasjon med høy multiplisitet, gir kun komplekse løsninger av ligning 3.8. Hvorvidt det er nødvendig å korrigere for overlevelsfraksjoner over 1 er usikkert, ettersom det er nok å aktivere en celle i en enhet, uavhengig av celleantallet i enheten, for å danne en koloni. Jeg har i denne oppgaven valgt å ikke korrigere for multiplisitet når overlevelsfraksjonen overstiger 1.

### Korreksjon av multiplisitetusikkerheten

For å beregne usikkerheten i  $M$ ,  $\Delta M$ , ble multiplisiteten telt på ulike steder i utvalgte celleflasker og avviket beregnet.  $\Delta M$  ble funnet lik 0.03.

Standardavviket til  $f$  kan uttrykkes som en funksjon av  $\Delta M$  og  $\Delta F$ , se utregning av Edin (2003):

$$\Delta f = \sqrt{\left(\frac{\Delta F}{\sqrt{M^2 - 4(M-1)F}}\right)^2 + \left(\frac{\frac{M + 2F - 2FM}{\sqrt{M^2 - 4(M-1)F}} - 1}{2(M-1)^2} \cdot \Delta M\right)^2} \quad (3.9)$$

### 3.6.3 Middelverdiberegning

For å dokumentere de små utslagene i overlevelse er det viktig med god statistikk. Dette ble sikret ved at hvert eksperiment ble utført minst tre ganger, før data ble vektet med hensyn på usikkerhet, og benyttet til å danne en felles kurvetilpasning. Formelverket for middelverdiberegning tilknyttet overlevelseskurvene ble utarbeidet av Opstad (2005):

Anta at det gjøres  $n$  identiske forsøk for å finne en sann verdi  $\mu$ . Den målte verdien for hvert forsøk er  $f_i$  med usikkerhet  $\Delta f_i$  og målingene er normalfordelt rundt  $\mu$ . Sannsynligheten for å måle  $f_i$  kan da uttrykkes (Opstad, 2005):

$$P(f_i, \mu) = \frac{1}{\sqrt{2\pi \cdot \Delta f_i^2}} e^{-\frac{1}{2} \left[ \frac{f_i - \mu}{\Delta f_i} \right]^2} \quad (3.10)$$

Sannsynligheten for at alle de målte verdiene er lik  $f_i$  er gitt som produktet av alle  $P(f_i, \mu)$ . Ettersom  $\mu$  er ukjent, skifter vi denne ut med den beregnede verdien  $\hat{\mu}$ . Denne verdien settes slik at den gir maksimal sannsynlighet for å finne  $f_i$ -verdiene vi allerede har funnet. Vi anvender dette videre til å maksimalisere ligning (3.10) med hensyn på  $\hat{\mu}$ :

$$P(\hat{\mu}) = \prod \left( \frac{1}{\sqrt{2\pi \cdot \Delta f_i^2}} e^{-\frac{1}{2} \sum \left[ \frac{f_i - \hat{\mu}}{\Delta f_i} \right]^2} \right) \quad (3.11)$$

Dette gir følgende uttrykk for  $\hat{\mu}$ :

$$\hat{\mu} = \frac{\sum f_i / \Delta f_i^2}{\sum 1 / \Delta f_i^2} \quad (3.12)$$

#### **Usikkerhet i middelverdiene**

Usikkerheten i middelverdien ("standard error") er gitt ved:

$$\Delta \bar{f} = \frac{\Delta f}{\sqrt{n}} \quad (3.13)$$

der  $\Delta f$  er standardavviket til målesettene og  $n$  antall målesett.

### **3.6.4 Representasjon av overlevelsesdata**

Overlevelseskurvene representerer overlevelsesfraksjonen som funksjon av dose i et semilogaritmisk plott. Plottene og data tilhørende disse er representert i vedlegg C sammen med rådata til plottene og middelverdiplott fra parallelle forsøk.

Overlevelseskurvene presentert i kapittel 4: Resultater er oversikts- og middelverdiplott av overlevelsesdata for uprimede og primede T-47D-celler plottet mot kurvetilpasninger basert på LQ- og IR-modellen for samme celletype fra Edin (upublisert, personlig meddelelse). Tilpasningene var utført i IDL, et program laget av Opstad (2005), der data ble tilpasset ved bruk av minste kvadrats metode og vektet med hensyn på de relative usikkerhetene i hver overlevelsesfraksjon.

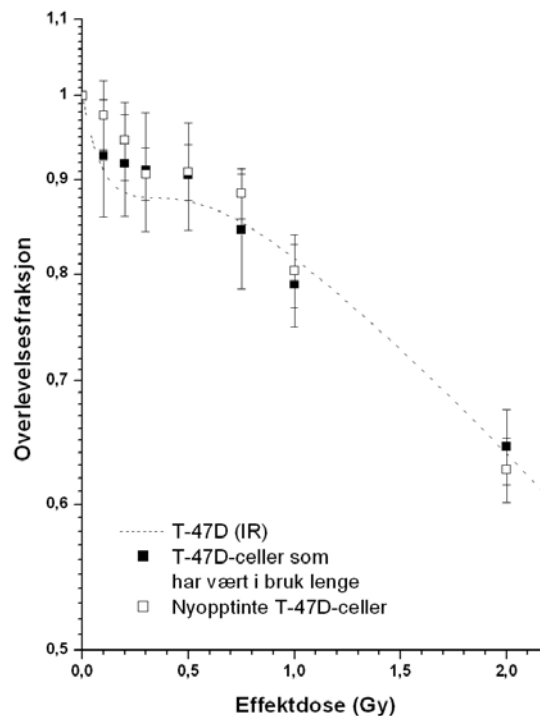
## 4 Resultater

### 4.1 Koloniforsøk

I foreliggende oppgave ble det utført overlevelsesforsøk med uprimede celler (T-47D) og celler primet med lav doserate (0.3 Gy/time) [ $^{60}\text{Co}$ ]- $\gamma$ -stråling (T-47D-P). Effektdosene ble levert ved akutt (dvs. HDR: høy doserate) (30 Gy/time) røntgenstråling.

#### 4.1.1 Koloniforsøk med uprimede T-47D-celler

Koloniforsøkene ble utført med røntgenstråling med effektdoser opptil 2 Gy, der hovedvekten av dosene var under 1 Gy, ettersom hypersensitivitetsfenomenet skulle undersøkes.



**Figur 4.1:** Overlevelsesfraksjoner som funksjon av effektdose (rtg) for nyopptinte T-47D-celler og T-47D-celler som har vært i bruk lenge.

Datapunktene representerer overlevelsesfraksjoner fra to forsøk med ulike T-47D-cellebatcher bestrålt med effektdoser, samt tilhørende "standard error". Den ene cellebatchen (■) har vært i bruk noe over 2 år, mens den andre cellebatchen (□) ble tatt opp fra fryseren for 7 uker før eksperimentet startet. Effektdosene ble levert ved 30 Gy/time (HDR) røntgenstråling. Datapunktene er plottet mot en tilpasning ved minste kvadraters metode til IR-modellen (kap 2.3.4, s.21) etter eksperimenter utført av Edin (upublisert, personlig meddelelse)

Det ble i utgangspunktet utført tre koloniforsøk, men jeg kom i skade for å starte disse forsøkene for kort tid etter opptining. Resultatene viser at overlevelsesfraksjonen er unormalt lav etter store doser (0.75-2 Gy) for disse cellene. Erfaring viser (Pettersen, personlig meddelelse) at cellene kan være preget av opptiningen i flere uker og at eksperimentene derfor bør vente. Forsøksstart var 3 uker etter opptining, og cellene ble ”klarert” i mikroskop, men dette kan ha vært for kort tid. Jeg viser disse forsøkene i vedlegg C.

For å sikre at de nyopptinte cellene hadde oppnådd stabile forhold etter stresset med opptining, ble et eksperiment utført 7 uker etter opptining. Her ble overlevelsesfraksjoner til de nyopptinte cellene og overlevelsesfraksjoner til T-47D-celler som hadde vært i bruk lenge sammenlignet med hverandre, og med en tilpasning ved minste kvadraters metode til IR-modellen (kap. 2.3.4, s.21) fra Edin (upublisert, personlig meddelelse) laget i IDL, se figur 4.1

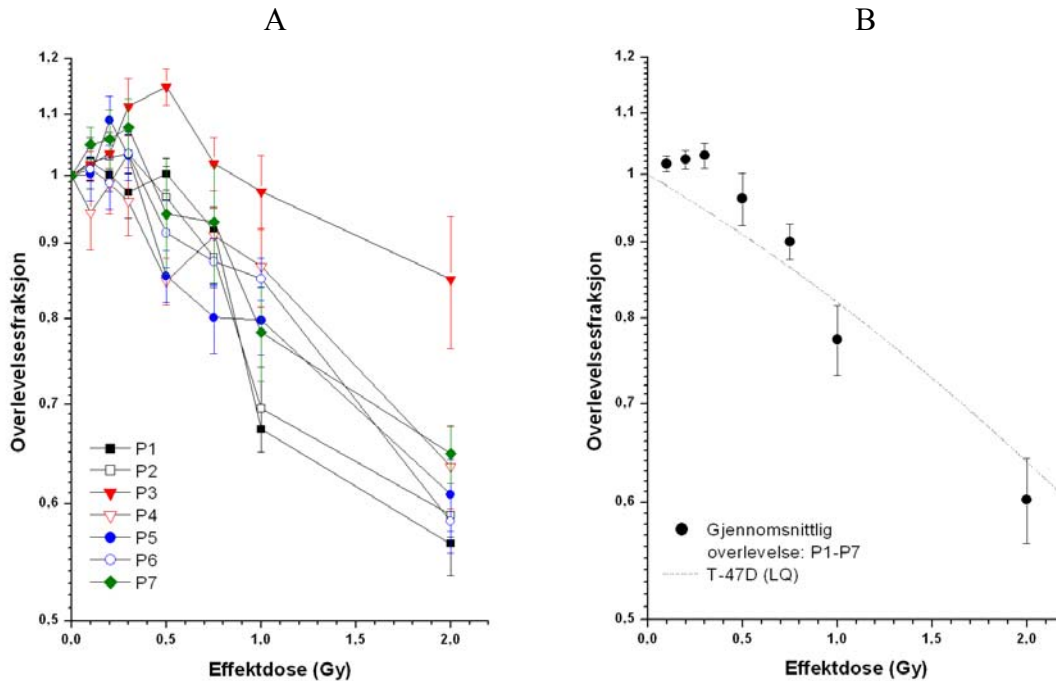
Overlevelsesdata i figur 4.1 viser godt samsvar mellom overlevelsesfraksjonene for begge cellebatchene og tilpasningen til IR-modellen, noe som betyr at cellebatchene responderer likt på effektbestråling. Figur 4.1 viser også at T-47D-cellene uttrykker HRS dersom de bestråles for effektdoser under 0.5 Gy, men at HRS-uttrykket for cellebatchene er noe lavere enn HRS-uttrykket gjengitt i tilpasningen til IR-modellen. Overlevelsesfraksjonen for T-47D-celler etter en 0.3 Gy effektdose er i denne oppgaven 0.91, noe som tilsvarer en HRS-respons på 9%.

#### **4.1.2 Koloniforsøk med T-47D-celler primet med lav doserate (LDR) bestråling (T-47D-P)**

De LDR-primede cellene (T-47D-P) ble eksponert for en 0.3 Gy primingdose før endelig effektdose. Primingdosen ble levert med 0.3 Gy/time (LDR) [ $^{60}\text{Co}$ ]- $\gamma$ -stråling ved Det Norske Radiumhospital den 17.august 2005 av Edin. Etterfølgende effektdose ble levert med 30 Gy/time (HDR) røntgenstråling 87-109 uker etter primingen. Stråledosene var i området 0-2 Gy, men hovedvekten av dosene var under 1 Gy ettersom hypersensitivitetsfenomenet skulle undersøkes.

Det ble i alt utført 7 forsøk, hvorav overlevelsesfraksjonene fra disse er gjengitt i figur 4.2A. Ved beregning av overlevelsesfraksjonene ble celler som kun mottok priming brukt som kontrollgruppe, slik at celleoverlevelsen kun viste responsen av effektdosen. Middelverdier av overlevelsesdata fra forsøkene, vektet med hensyn på usikkerheten i hver måling, er gjengitt i figur 4.2B. Middelverdiene ble plottet mot en tilpasning ved minste kvadraters metode til LQ-modellen (kap. 2.3.2, s.18) for T-47D-celler etter eksperimenter utført av Edin (upublisert, personlig meddelelse).

De eksperimentelle data for hvert enkeltforsøk, samt overlevelseskurvene tilhørende disse er gjengitt i vedlegg C.



**Figur 4.2: Overlevelsesfraksjoner (A) og gjennomsnittlige overlevelsesfraksjoner (B) som funksjon av effektdose (rtg) for primede T-47D-celler (betegnet T-47D-P)**

Datapunktene representerer overlevelsesfraksjoner (A) og overlevelsesfraksjonenes middelerverdier (B), samt tilhørende "standard error", for syv uavhengige forsøk (P1-P7) med T-47D-celler eksponert med en 0.3 Gy primingdose før en effektdose. Primingdosen ( $^{60}\text{Co}$ )- $\gamma$ -stråling) ble levert 17.08.2005 av Edin ved lav doserate (LDR) på 0.3 Gy/time, mens effektdosen (rtg) ble gitt inntil 109 uker etter primingen ved høy doserate (HDR) 30 Gy/time. Middelerverdiene i figur B ble beregnet ved å vekte overlevelsesfraksjonene i figur A etter standardavviket i hvert forsøk. Middelerverdiene er plottet mot en tilpasning ved minste kvadraters metode til LQ-modellen (kap. 2.3.2, s.18) for effektbestrålte, dvs. uprimede T-47D-celler, etter eksperimenter utført av Edin (upublisert, personlig meddelelse).

Middelerverditilpasningene, samt majoriteten av overlevelsesfraksjonene (figur 4.2), viser at overlevelsesfraksjonene ligger over 1 i doseområdet som gav hypersensitivitet ved effektbestråling uten priming (figur 4.1). Overlevelsesfraksjonene ligger også over LQ-modellen, hvilket betyr at våre T-47D-P-celler ikke uttrykker HRS ved små doser.

For å undersøke om oversvinget over 1.0 i overlevelsesfraksjon var signifikant ble det utført en tosidig t-test (tabell 4.1), som testet om overlevelsesfraksjonene i figur 4.2A



etter henholdsvis 0.1, 0.2 og 0.3 Gy effektdose var signifikant forskjellig fra 1. Overlevelsesfraksjonene tilhørende forsøkene er gjengitt i vedlegg C.

Dose	0.1 Gy	0.2 Gy	0.3 Gy
P-verdi	0.460	0.086	0.134

**Tabell 4.1: P-verdi fra tosidig t-tester som tester om celleoverlevelsen for LDR-primede celler etter henholdsvis 0.1, 0.2 og 0.3 Gy effektdose er signifikant forskjellig fra 1**

P-verdier er beregnet ved å t-teste overlevelsesfraksjonene for primede celler fra 7 forsøk (P1-P7) etter henholdsvis 0.1, 0.2 og 0.3 Gy effektbestråling mot overlevelsesfraksjon satt til 1. Overlevelsesdata til de testede T-47D-P cellene er gjengitt i vedlegg C.

P-verdiene i tabell 4.1 tyder på at det ikke er signifikant høyere celleoverlevelse for primede celler etter hverken en 0.1 Gy ( $p = 0.460$ ), 0.2 Gy ( $p = 0.086$ ) eller 0.3 Gy ( $p = 0.134$ ) effektbestråling, men vi kan heller ikke utelukke en slik mulighet siden p-verdiene viser en svak trend i den retningen.

Ettersom p-verdiene ikke viser signifikant forskjell fra 1.0 celleoverlevelse ved hverken 0.1, 0.2 eller 0.3 Gy effektdose, valgte vi å utføre en lineær tilpasning til punktene og  $y = 1$ , for å bestemme den initielle helningsvinkelen  $\alpha$ . Tilpasningen ble utført for hvert av de 7 enkeltforsøkene (P1-P7). Regresjonen viste helningsvinkel lik:  $6.70^\circ \pm 2.64^\circ$ . For å undersøke om helningsvinkelen er signifikant større enn  $0^\circ$  helningsvinkel, ble det utført en ensidig t-test, se tabell 4.2. T-testen viste signifikant ( $p = 0.0015$ ) større helningsvinkel enn  $0^\circ$ , noe som betyr at vi har oversving over 1.0 i overlevelsesfraksjon.

Helningsvinkel, $\alpha$	P-verdi
$6.70^\circ \pm 2.64^\circ$	0.0015

**Tabell 4.2: Gjennomsnittlig inituell helningsvinkel og p-verdi fra ensidig t-test, som tester om den initielle helningsvinkelen er signifikant større enn  $0^\circ$**

De initielle helningsvinklene ble beregnet ved å lage en lineær tilpasning til overlevelsesfraksjonene etter 0, 0.1, 0.2, og 0.3 Gy effektbestråling for de syv utførte koloniforsøkene (P1-P7). Helningsvinkelen i tabellen representerer gjennomsnittlig helningsvinkel av disse. Den ensidige t-testen tester om helningsvinkelen er signifikant forskjellig fra 0, ved å teste de syv ulike helningsvinklene mot  $0^\circ$  helningsvinkel.

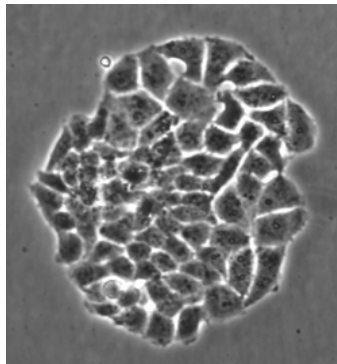
## 4.2 Filmforsøk

I foreliggende oppgave er hensikten å bruke "time-lapse" film til å detektere celleoverlevelsen og mulige faktorer som kan forklare variasjonene i celleoverlevelse som følge av priming og effektbestråling, da spesielt med tanke på den høyere overlevelsesfraksjonen hos primede celler som mottar 0.3 Gy effektbestråling, enn hos primede celler som ikke gjør dette.

Ved "time-lapse" filmobservasjon har det blitt oppdaget en rekke hendelser som kan være bidragsytende til en slik forhøyet overlevelse. Hendelsene, samt hvordan disse varierer som følge av priming og effektbestråling, presenteres i kapittel 4.3. De fleste av disse hendelsene inntreffer relativt sjeldent og det vil derfor ikke foreligge tilstrekkelig statistikk til å si noe sikkert om observasjonene. Jeg vil allikevel drøfte mulige trender observasjonene kan vise og hvordan disse kan innvirke på celleoverlevelsen, selv om trendene ifølge t-tester ikke er signifikante. T-testene for de ulike observasjonene, med tilhørende p-verdier gjengis etter mal presentert i figur 3.4 (s.33).

### 4.2.1 Overlevelse

Ved filmforsøk har vi valgt å definert en koloni som en celleansamling bestående av minst 6 celler, der det har skjedd en celledeling i løpet av siste periode på ca. 30 timer (dvs. ca. en normal celsesyklusvarighet for T-47D-celler). Denne definisjonen har blitt valgt ut fra erfaring basert på observasjon av makroskopiske kolonier dannet ved dyrking av cellene. Kun et minimalt antall kolonier har blitt utelatt på bakgrunn av denne.



**Figur 4.3: Koloni**

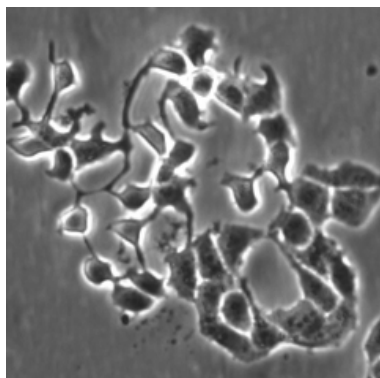
*Figuren viser en typisk koloni, dvs. en celleansamling bestående av minst 6 celler, der det har forekommet celledeling siste celsesyklustid. Det typiske var at koloniene hadde langt mer enn 6 celler (denne har over 70 celler).*

Denne definisjonen er noe forskjellig fra kolonidefinisjonen ved koloniforsøk, der en koloni defineres som en celleansamling bestående av minst 50 celler. Ettersom målet med

denne oppgaven er å tallfeste eventuelle forskjeller i cellens vekstmønster som funksjon av priming og effektbestråling, er tilstrekkelig statistikk helt avgjørende for å kunne trekke endelige slutninger. For å oppnå dette innenfor masteroppgavens tidsbegrensning ble celletettheten i filmforsøkene økt betraktelig. Samtidig måtte forsøkstiden kortes ned til 7 dager fordi koloniene etter det kunne vokse inn i hverandre. Bildesnittene ble valgt manuelt etter ønsket tetthet og cellenes orientering i forhold til hverandre. Ettersom forsøkstiden ble redusert, begrenset dette antall delinger cellene kunne gjennomføre innenfor tidsrommet og dermed også kolonistørrelsen. Levedyktige kolonier etter 7 dager defineres således i denne sammenheng som celleansamlinger inneholdende minimum 6 celler. Det tas ikke hensyn til eventuell kolonisammenvekst dersom celleansamlingen inneholdt minst 6 celler før den eventuelle sammenveksten fant sted. En slik vurdering vil kunne gi noe feil, men ettersom cellene i et overlevelsesforsøk vil ha en betydelig større avstand mellom hverandre enn for filmforsøk, grunnet lavere celleutsåingstetthet, er det ikke usannsynlig at disse cellene ville dannet selvstendige kolonier. Eventuelle feilberegninger som følge av en slik antagelse vil drøftes nærmere i kapittel 5.6.1 (s.73).

T-47D-celler brukt i denne oppgaven hadde en cellesyklusetid på omtrent 30 timer (bestemt fra filmobservasjon), og en koloni med opphav fra en enkeltcelle kan da maksimalt inneholde 64 celler ved filmslutt dersom celleforøkelsen har vært optimal (6 celledelinger). T-47D-P-cellene ble observert å ha noe kortere delingstid, omtrent 27 timer.

En strengkoloni oppfyller kolonidefinisjonen, men har et vekstmønster ulikt en vanlig koloni. I en strengkoloni er flere av nabocellene bundet til hverandre ved en felles streng, i motsetning til i vanlige kolonier der cellene ligger tett inntil hverandre. Strengforbindelsene mellom cellene gir en nettlignende kolonistruktur og koloniens utstrekning blir vesentlig større enn hva celleantallet skulle tilsi.



**Figur 4.4: Strengkoloni**

*En strengkoloni er en koloni der flere av nabocellene er bundet til hverandre ved en felles streng.*

”Plating efficiency” (”PE”), er beregnet som forholdet mellom antall levedyktige kolonier ved filmslutt,  $t = 7$  dager, og antall enheter ved filmstart,  $t = 0$ . Denne verdien ble beregnet på to måter, ved å ta gjennomsnittet henholdsvis av overlevelsen per bildesnitt, dvs. synsfeltet i mikroskopet (tabell 4.3), og per celleflaske (tabell 4.4), der hver celleflaske besto av bilder fra tre bildesnitt. Det ble valgt å gjøre dette på to måter siden det ikke var noen av de to måtene som var innlysende mer korrekt enn den andre. Når celleoverlevelsen refereres til i teksten valgte vi derfor å inkludere overlevelsedata fra både tabell 4.3 og 4.4. Dette vil si at celleoverlevelsen for ubestrålte T-47D-celler fra tabell 4.3 og 4.4 vil refereres til som (0.848; 0.827), der første parameter gjengir celleoverlevelsen per bildesnitt (tabell 4.3) og andre parameter celleoverlevelsen per flaske (tabell 4.4), se forkortelser og definisjoner s.5. P-verdiene fra de tilhørende t-testene gjengis på samme måte.

Det ble korrigert for multiplisitet dersom overlevelsen ble funnet å være lavere hos de 0.3 Gy effektbestrålte cellene, enn hos kontrollcellene.

	T-47D	T-47D + 0.3 Gy	T-47D-P	T-47D-P + 0.3 Gy
<b>Start; t = 0</b>				
Antall enkeltceller	8.4 ± 1.8	9.1 ± 1.9	8.4 ± 1.9	9.0 ± 2.1
Antall dubletter	2.5 ± 0.6	2.8 ± 0.6	1.5 ± 0.3	1.8 ± 0.4
Antall tripletter+	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.0 ± 0.0
Totalt antall startgrupper	11.8 ± 2.6	12.8 ± 2.6	10.1 ± 2.2	10.8 ± 2.6
<b>Slutt; t = 7dager</b>				
Antall enkeltceller	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.5 ± 0.1
Antall kolonier	9.2 ± 2.0	9.8 ± 2.0	7.3 ± 1.6	8.8 ± 2.1
Antall strengkolonier	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.2
Totalt antall sluttgrupper	10.0 ± 2.2	10.5 ± 2.2	8.4 ± 1.9	10.2 ± 2.4
<b>Forhold start-slutt</b>				
Andel enkeltceller	0.022 ± 0.005	0.008 ± 0.002	0.008 ± 0.002	0.050 ± 0.012
Andel kolonier	0.794 ± 0.173	0.763 ± 0.156	0.712 ± 0.159	0.813 ± 0.192
Andel strengkolonier	0.055 ± 0.012	0.059 ± 0.012	0.127 ± 0.028	0.097 ± 0.023
”Plating efficiency”	0.848 ± 0.185	0.822 ± 0.168	0.839 ± 0.188	0.910 ± 0.214
”Plating efficiency” mhp M <sup>(1)</sup>		0.753 ± 0.206		
Overlevelseshfraksjon <sup>(2)</sup>		0.888		1.085

(1) ”Plating Efficiency” korrigert for multiplisitet

(2) Overlevelseshfraksjon for celler etter effektbestråling er definert som ”plating efficiency” for effektbestrålte celler dividert med ”plating efficienvy” for celler uten effektbestråling. Overlevelseshfraksjonen etter effektbestråling er både bestemt for villtype (uprimede) T-47D-celler og T-47D-celler primet ved 0.3 Gy lav doserate (0.3 Gy/time) røntgenstråling, der pilene angir hvilke ”PE” som er testet mot hverandre

**Tabell 4.3: Beregning av ”plating efficiency” for T-47D-celler per bildesnitt**

Gjennomsnittlige overlevelse per bildesnitt, dvs. per synsfelt i mikroskopet, for T-47D-celler som følge av priming og effektbestråling.

	T-47D	T-47D + 0.3 Gy	T-47D-P	T-47D-P + 0.3 Gy
<b>Start; t = 0</b>				
Antall enkeltceller	25.1 ± 0.3	27.3 ± 0.8	23.9 ± 1.0	27.0 ± 1.7
Antall dubletter	7.6 ± 0.5	8.4 ± 0.5	4.1 ± 0.3	5.5 ± 0.3
Antall tripletter+	2.6 ± 0.3	2.9 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.0 ± 0.0
Totalt antall startgrupper	35.3 ± 0.6	38.5 ± 0.8	28.7 ± 1.2	32.5 ± 1.9
<b>Slutt; t = 7dager</b>				
Antall enkeltceller	0.9 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	1.5 ± 0.2
Antall kolonier	27.6 ± 0.9	29.3 ± 0.9	20.9 ± 1.1	26.3 ± 1.7
Antall strengkolonier	1.7 ± 0.3	2.0 ± 0.2	2.7 ± 0.3	2.8 ± 0.2
Totalt antall sluttgrupper	30.1 ± 0.9	31.6 ± 0.9	23.9 ± 1.0	30.7 ± 1.8
<b>Forhold start-slutt</b>				
Andel enkeltceller	0.024 ± 0.002	0.008 ± 0.002	0.011 ± 0.003	0.044 ± 0.006
Andel kolonier	0.776 ± 0.016	0.757 ± 0.014	0.712 ± 0.025	0.800 ± 0.013
Andel strengkolonier	0.051 ± 0.009	0.054 ± 0.005	0.122 ± 0.022	0.102 ± 0.010
"Plating efficiency"	0.827 ± 0.011	0.811 ± 0.014	0.834 ± 0.016	0.902 ± 0.009
"Plating efficiency" mhp M <sup>(1)</sup>		0.740 ± 0.018		
Overlevelsesfraksjon <sup>(2)</sup>		0.895		1.082

(1) "Plating efficiency" korrigert for multiplisitet

(2) Overlevelsesfraksjon for celler etter effektbestråling er definert som "plating efficiency" for effektbestrålte celler dividert med "plating efficienvy" for celler uten effektbestråling. Overlevelsesfraksjonen etter effektbestråling er både bestemt for villtype (uprimede) T-47D-celler og T-47D-celler primet ved 0.3 Gy lav doserate (0.3 Gy/time) røntgenstråling, der pilene angir hvilke "PE" som er testet mot.

#### Tabell 4.4: Beregning av "Plating efficiency" for T-47D-celler per celleflaske

Gjennomsnittlige overlevelse per celleflaske for T-47D-celler som følge av priming og effektbestråling, der hver celleflaske gjengir gjennomsnittoverlevelsen for celleflaskens tre bildesnitt.

Tabell 4.3 og 4.4 viser økt "plating efficiency" ("PE"), dersom primede celler mottar en effektdose, i forhold til om de ikke gjør dette. Denne økningen er riktignok ikke signifikant ( $p = 0.116; 0.150$ ) ifølge t-test (tabell 4.5), men den tilsvarer at overlevelsesfraksjonen beregnet som forholdet mellom "PE" for primede celler som har mottatt effektdose og "PE" for de som kun har mottatt priming er 1.08 (dvs. 8% over 1.0). Dette samsvarer med oversvinget over 1.0 for overlevelsesfraksjonen for koloniforsøk vist i figur 4.2B (s.41) for de samme cellepopulasjonene, men dette oversvinget var altså noe større i filmforsøkene enn i koloniforsøkene.

Årsaken til oversvinget er over 1.0 for overlevelsesfraksjonen etter effektbestråling av LDR-primede celler kan ha sin årsak i en av to følgende teorier som skal testes:

- Teori 1: Oversvinget kan skyldes at primede celler har evnen til å danne flere enn 1 koloni per kolonidannende enhet. Denne effekten må i såfall øke for de primede cellene dersom disse mottar en etterfølgende effektdose.
- Teori 2: Oversvinget kan også skyldes motsatt mulighet, nemlig at det av en eller annen grunn dannes færre enn en koloni per kolonidannende enhet for primede celler. Denne effekten må i såfall reduseres for de primede cellene dersom disse mottar en etterfølgende effektdose.

Dersom oversvinget i overlevelsesfraksjonen skyldes effekter som virker reduserende på overlevelsen for de primede cellene, bør vi ved filmobservasjon observere lavere "PE" for primede enn for uprimede celler i forsøk uten effektdose. En slik reduksjon i målt "PE" observeres ikke i tabell 4.3 og 4.4, noe som tyder på den forhøyede overlevelsen for primede celler som mottar effektdose ikke kan forklares ved effekter som virker reduserende på koloniantallet. Dette peker i retning av at den forhøyede overlevelsen heller må skyldes høyere grad av koloniøkende mekanismer hos primede celler, som følge av mottatt effektdose. Mekanismer som kan gi opphav til økt celleoverlevelse introduseres i kapittel 4.3.

Tabell 4.3 og 4.4 viser høyere "PE" dersom en effektdose gis til T-47D-P-celler istedenfor T-47D-celler, hvilket støttes av utført t-test, der p-verdiene ( $p = 0.061$ ;  $0.075$ ) nærmer seg signifikansnivå (tabell 4.5).

Overlevelsesfraksjonen for uprimede celler etter 0.3 Gy effektdose tilsvarer omtrent 0.89 (dvs.  $0.753/0.848$  i tabell 4.3;  $0.740/0.827$  i tabell 4.4). Denne reduksjonen fra 1, som ikke er signifikant ifølge t-test ( $p = 0.326$ ;  $0.345$ , tabell 4.5), stemmer godt overens med overlevelsesfraksjonen for koloniforsøk ved 0.3 Gy effektdose, som beregnes lik 0.91 (figur 4.1). Dette betyr at overlevelsesdata fra både film- og koloniforsøk peker i retning av at T-47D-cellene uttrykker HRS som følge av 0.3 Gy HDR-effektdose.

Overlevelsesfraksjonen for primede celler etter en 0.3 Gy effektdose tilsvarer 1.08. (dvs.  $0.910/0.839$  i tabell 4.3;  $0.902/0.834$  i tabell 4.4). Dette oversvinget over 1.0 i overlevelsesfraksjon, som ifølge t-test ikke er signifikant ( $p = 0.116$ ;  $0.150$ , tabell 4.5), stemmer godt overens med tilsvarende overlevelsesfraksjon i koloniforsøk, som beregnes opp til 1.05 (figur 4.2B). Dette betyr at overlevelsesfraksjonene for både film- og koloniforsøk peker i retning av at T-47D-P-cellene uttrykker oversving i celleoverlevelse etter en 0.3 Gy HDR-effektdose

En interessant observasjon er at både uttrykket av HRS og oversving, og dermed også det induserte bortfallet av HRS, vises større i film enn i koloniforsøk. Om dette er tilfeldig,

og hvilken av metodene gjengir overlevelsesfraksjonene på best mulig måte vil drøftes i kapittel 5.2, der det vil utføres korreksjon på målt PE.

Hypotese:	P-verdi per bildesnitt	P-verdi per celleflaske
Gir effektdosen endret "PE" på uprimede celler?	0.326	0.345
Gir effektdosen endret "PE" på primede celler?	0.116	0.150
Gir priming noen endring i PE?	0.465	0.382
Gir priming før effektdose noen endring i PE?	0.061	0.075

**Tabell 4.5:** *P-verdier fra tosidige t-tester som tester om det er signifikante forskjeller i overlevelsesfraksjon etter en primingdose eller en effektdose for T-47D-celler*

*P-verdier er beregnet hhv per bildesnitt og per celleflaske, der en celleflaske består av tre bildesnitt. Testens formål er å påpeke eventuell signifikant forskjell i celleoverlevelse hos T-47D-celler som funksjon av priming og effektbestråling. Tabellen er satt opp etter oppsettsmal for t-test, presentert i figur 3.4, s.33.*

### 4.3 Cellulære hendelser som kan påvirke koloniantallet

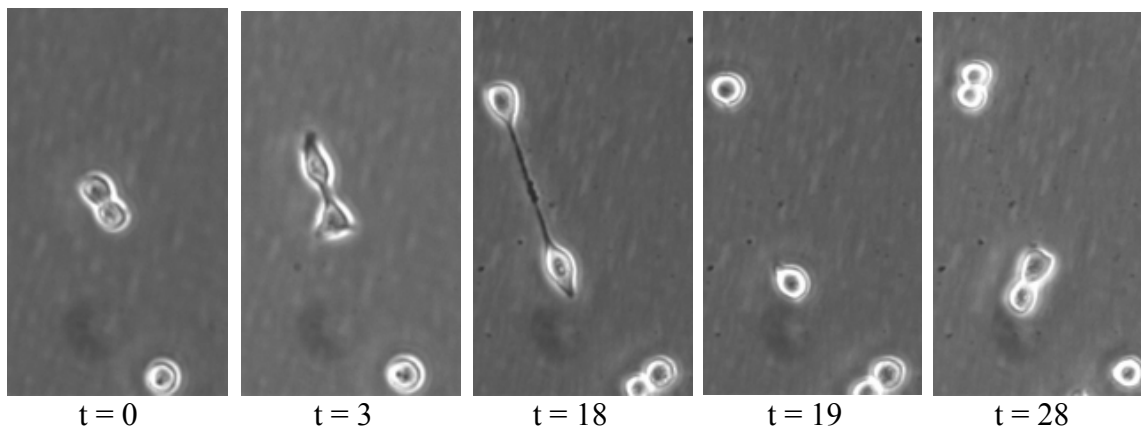
For å undersøke om oversvinget i overlevelsesfraksjonen for primede celler etter effektbestråling kan skyldes cellulære hendelser som påvirker koloniantallet, ble "time-lapse" film benyttet til å kartlegge alle cellulære hendelser som skjer hver enkelt celle innenfor et tidsrom på 7 dager.

Ved filmobservasjon ble en rekke reaksjonsmønstre hos de utsådde cellene og deres etterkommere observert. Flere av disse kan i teorien bidra til økt koloniantall, deriblant dublettdeling, kolonideling og cellemigrasjon ved at celler migrerer ut fra kolonier, hvilket defineres nedenfor.

#### 4.3.1 Hendelser som kan øke koloniantallet

##### Dublettdeling

Ved dublettdeling splittes en dublett opp til to enkeltceller ved at dublettcellene migrerer fra hverandre ved hjelp av en strengforbindelse før denne brytes. Dublettens familiærhet kan som regel ikke fastslås, ettersom det er uklart om startenheter bestående av flere celler ved  $t = 0$  har opphav fra samme celle. Cellene kan ha festet seg nær hverandre i flasken for videre å ha smeltet eller migrert sammen.



**Figur 4.5: Dublettdeling**

Bildeserien illustrerer dublettdeling, der en startdublett splittes opp til to enkeltceller. Tidsaksen angir tiden i timer mellom de ulike hendelsene.

Filmobservasjon har vist at enkeltcellene fra dublettdeling kan danne egne kolonier, gro sammen med hverandre eller med andre kolonier, hvilket betyr at dublettdeling teoretisk kan bidra til et økt koloniantall. Hvorvidt andelen dublettdelinger varierer som følge av bestråling undersøkes ved å beregne dublettdelingshyppigheten, dvs. andel dublettdelinger per startenhet, som følge av priming og effektbestråling.

	T-47D	T-47D + 0.3 Gy	T-47D-P	T-47D-P + 0.3 Gy
<b>Dublettdelingshyppighet</b> (andel av utsådde enheter)	0.028 ± 0.012	0.051 ± 0.025	0.079 ± 0.024	0.052 ± 0.020
<b>Cellen:</b>				
Danner egen koloni	0.015 ± 0.007	0.046 ± 0.023	0.065 ± 0.015	0.035 ± 0.021
Gror sammen med søstercelle	0.033 ± 0.017	0.059 ± 0.032	0.068 ± 0.032	0.047 ± 0.021
Gror sammen med annen koloni	0.000 ± 0.000	0.003 ± 0.003	0.022 ± 0.011	0.014 ± 0.014
Uvisst	0.008 ± 0.005	0.000 ± 0.000	0.004 ± 0.004	0.007 ± 0.007

**Tabell 4.6: Dublettdelingshyppighet som funksjon av priming og effektbestråling**

Verdiene viser andelen av enhetene ved  $t = 0$  som gir opphav til dublettdelinger, samt enkeltcellenes påfølgende forløp per startenhet som følge av priming og effektbestråling.

Tabell 4.6 viser økt dublettdelingshyppighet, samtidig som tabell 4.3 og 4.4 (s.45-46) viser redusert "PE" dersom uprimede celler mottar effektbestråling. For primede celler er det motsatt. Dublettdelingshyppigheten faller (fra 0.079 til 0.052, tabell 4.6) mens "PE" øker (fra 0.839 til 0.910, tabell 4.3; fra 0.834 til 0.902, tabell 4.4) etter effektbestråling. Disse trendene, som ikke er signifikante ifølge p-verdier ( $p = 0.41$ ) i tabell 4.7, utelukker at dublettdeling bidrar til henholdsvis oversving av overlevelsesfraksjon for primede eller HRS for uprimede celler som begge mottar effektdose. Dublettdeling er heller ikke



bidragsytende til den observerte forskjellen i overlevelse mellom disse, dvs. det induserte bortfallet av HRS, etter 0.3 Gy HDR effektdose gitt uprimede (figur 4.1, s.39) og primede celler (figur 4.2, s.41) (se problemstilling s.8).

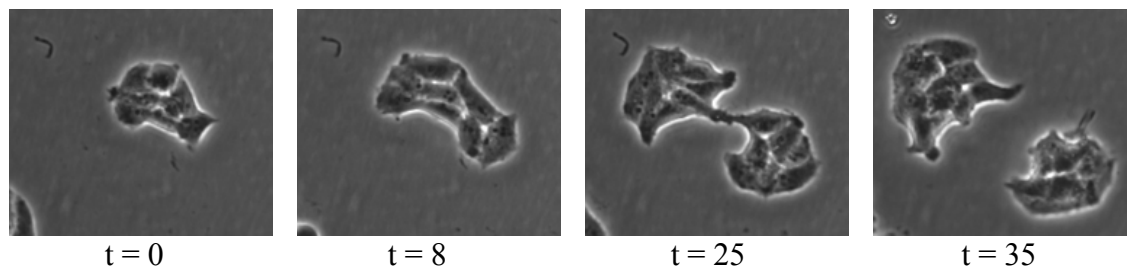
<b>Hypotese:</b>	<b>P-verdi</b>
Gir effektdosen økt dublettdelingshyppighet på uprimede celler?	0.45
Gir effektdosen økt dublettdelingshyppighet på primede celler?	0.41
Gir priming noen endring i dublettdelingshyppighet i seg selv?	0.09
Gir priming før effektdose noen endring i dublettdelingshyppighet?	0.98

**Tabell 4.7: P-verdier fra signifikanstest som tester om det er signifikant forskjell mellom andelen dublettdelinger etter en priming eller en effektdose**

*P-verdier fra tosidige t-tester av dublettdelingshyppighet som funksjon av priming og effektbestråling fra flere forsøk. Tabellen er satt opp etter oppsettsmal for t-test, presentert i figur 3.4, s.33.*

### Kolonideling

Kolonideling betegner at en koloni eller strengkoloni splittes opp i to deler, der hver del inneholder minimum 2 celler.



**Figur 4.6: Kolonideling**

*Bildeserien viser hvordan en koloni deles opp til to kolonier. Tidsaksen angir tiden i timer mellom de ulike hendelsene.*

Celleansamlingene kan danne egne kolonier eller eventuelt gro sammen med hverandre eller andre kolonier, hvilket betyr at kolonideling teoretisk kan bidra til økt koloniantall og dermed økt overlevelse. For å se om kolonideling kan være bidragsytende til henholdsvis HRS og den forhøyede celleoverlevelsen etter en effektdose gitt LDR-primede celler, ble kolonidelingshyppigheten, dvs. andel kolonidelinger per startenhet, beregnet som følge av priming og effektbestråling:

	T-47D	T-47D + 0.3 Gy	T-47D-P	T-47D-P + 0.3 Gy
<b>Kolonidelingshyppighet</b>	0.045 ± 0.021	0.058 ± 0.019	0.081 ± 0.024	0.106 ± 0.015
Kolonien stabiliseres	0.019 ± 0.012	0.021 ± 0.009	0.042 ± 0.027	0.050 ± 0.015
Kolonien blir ustabil	0.030 ± 0.026	0.013 ± 0.007	0.004 ± 0.004	0.009 ± 0.009
Koloniens stabilitet endres ikke	0.041 ± 0.017	0.082 ± 0.026	0.115 ± 0.044	0.153 ± 0.036
<b>Celleansamlingen:</b>				
Danner egen koloni	0.022 ± 0.015	0.044 ± 0.014	0.077 ± 0.044	0.070 ± 0.016
Gror sammen med søsteransamlingen	0.067 ± 0.042	0.068 ± 0.035	0.076 ± 0.037	0.121 ± 0.039
Gror sammen med annen koloni	0.000 ± 0.000	0.003 ± 0.003	0.009 ± 0.009	0.021 ± 0.016

**Tabell 4.8: Kolonidelingshyppighet som funksjon av priming og effektbestråling**

Verdiene viser andelen kolonidelinger, samt celleansamlingenes påfølgende forløp per startenhet som følge av priming og effektbestråling.

Verdiene i tabell 4.8 viser høyere kolonidelingshyppighet dersom primede celler mottar effektdose (0.106), enn om de ikke gjør dette (0.081). Samtidig viser tabellen høyere kolonidelingshyppighet for primede enn for uprimede celler, uavhengig om ingen eller begge cellepopulasjonene har mottatt etterfølgende effektdose.

Trendene, som ikke er signifikant ifølge p-verdier i tabell 4.9, virker i retning av at kolonideling kan bidra til økt koloniantall, ettersom økningen i kolonidelingshyppighet som følge av priming og effektdose følger nogenlunde samme trend som overlevelsedata i tabell 4.3 og 4.4 (s.45-46).

Kolonidelingshyppigheten, i kombinasjon med andelen celleansamlinger som danner egne kolonier, antydes fra tabell 4.8 snarere å øke enn å reduseres dersom uprimede celler gis en effektdose (p = 0.77, tabell 4.9). Dette taler imot at kolonideling kan være bidragsytende til HRS, snarere vil den virke i motsatt retning.

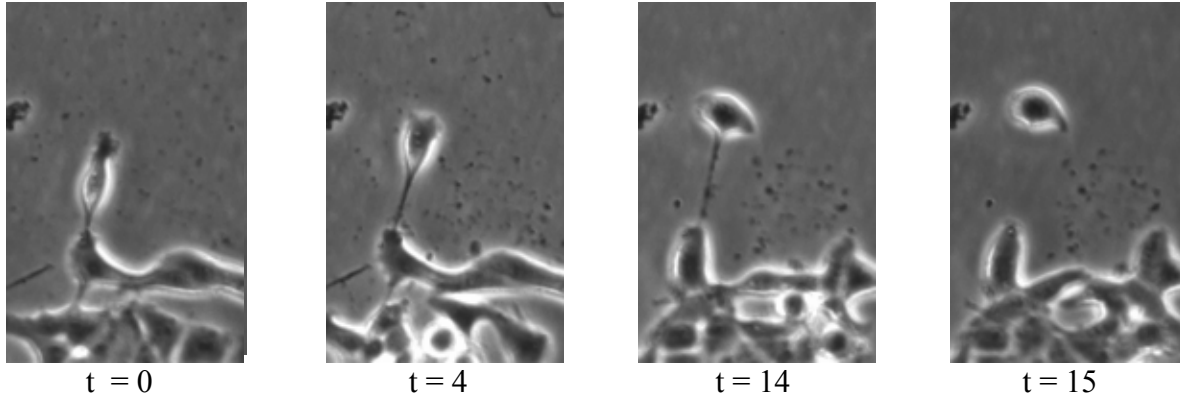
<b>Hypotese:</b>	<b>P-verdi</b>
Gir effektdosen økt frekvens av kolonideling for uprimede celler?	0.77
Gir effektdosen økt frekvens av kolonideling for primede celler?	0.63
Gir priming noen endring i frekvens av kolonideling i seg selv?	0.23
Gir priming før effektdose noen endring i frekvens av kolonideling?	0.13

**Tabell 4.9: P-verdier fra signifikanstest som tester om det er signifikant forskjell mellom andelen kolonidelinger etter en priming eller en effektdose**

P-verdier fra tosidige t-tester av kolonidelingshyppighet som funksjon av priming og effektbestråling fra flere forsøk. Tabellen er satt opp etter oppsettsmal for t-test, presentert i figur 3.4, s.33.

## Cellemigrasjon

Ved cellemigrasjon løsrives en enkeltcelle fra en koloni ved at cellen bryter sine bindinger til kolonien. Løsrivelsen skjer ved at cellen trekker seg ut fra kolonien med en strengforbindelse, før prosessen avsluttes ved at strengen brytes.



**Figur 4.7: Cellemigrasjon**

Bildeserien viser hendelsesforløpet for en migrasjon ut fra koloni. Tidsaksen angir tiden i timer mellom de ulike hendelsene.

En løsrevet celle kan blant annet danne sin egen koloni, søke seg til andre kolonier, tas inn igjen av morkolonien eller danne et vandrende kompleks (defineres i figur 4.9, s.58), noe som betyr at cellemigrasjon teoretisk sett kan bidra til økt "PE". For å se om kolonideling er bidragsytende til variasjoner som endrer den observerte overlevelsesfraksjonen ble kolonidelingshyppigheten, dvs. andel kolonideling per startenheter, beregnet som følge av priming og effektbestråling:

	T-47D	T-47D + 0.3 Gy	T-47D-P	T-47D-P + 0.3 Gy
<b>Andel celler som migrerer ut av koloni</b>	0.055 ± 0.019	0.083 ± 0.023	0.133 ± 0.050	0.193 ± 0.056
Morkolonien stabiliseres	0.012 ± 0.006	0.023 ± 0.009	0.023 ± 0.019	0.012 ± 0.008
Morkolonien blir ustabil	0.022 ± 0.022	0.005 ± 0.003	0.008 ± 0.008	0.000 ± 0.000
Morkoloniens stabilitet endres ikke	0.020 ± 0.009	0.044 ± 0.014	0.092 ± 0.025	0.177 ± 0.057
<b>Andel migrasjonsceller som:</b>				
Danner egen koloni	0.000 ± 0.000	0.005 ± 0.003	0.004 ± 0.004	0.013 ± 0.006
Gror sammen med mor	0.030 ± 0.022	0.049 ± 0.017	0.107 ± 0.057	0.135 ± 0.070
Finner koloni ved 1.forsøk	0.008 ± 0.005	0.016 ± 0.010	0.014 ± 0.006	0.017 ± 0.011
Ikke finner koloni/ deler seg ikke	0.014 ± 0.010	0.006 ± 0.004	0.005 ± 0.005	0.004 ± 0.004
Danner vandrende kompleks	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.004 ± 0.004	0.005 ± 0.005
Migrerer ut av bilde	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
Ukjent videre forløp. filmen slutter	0.004 ± 0.004	0.007 ± 0.005	0.000 ± 0.000	0.023 ± 0.016

**Tabell 4.10: Migrasjonshyppighet som funksjon av priming og effektbestråling**

Verdiene viser migrasjonshyppighet og påfølgende forløpshyppigheter som funksjon av priming og effektbestråling. Hyppighetene gir gjennomsnittlig andel celler per forsøk som gjennomfører migrasjon og påfølgende alternative forløp i forhold til gjennomsnittlig andel startenheter.

Tabell 4.10 viser høyere migrasjonshyppighet ( $p = 0.04$ ) for primede (0.193) enn for uprimede celler (0.083), etter effektbestråling. Samtidig vises også høyere migrasjonshyppighet for primede enn for uprimede celler, uavhengig av om ingen eller begge av de nevnte cellepopulasjonene har mottatt etterfølgende effektdose. Disse trendene peker i retning av at cellemigrasjon kan være bidragsytende til økt antall kolonier etter effektbestråling for primede celler, ettersom variasjonen i cellemigrasjon som følge av priming og effektbestråling, har samme variasjonsmønster som celleoverlevelsedata i tabell 4.3 og 4.4 (s.45-46).

T-test i tabell 4.11 viser en signifikant økning i migrasjonshyppighet etter effektdosen for primede celler ( $p = 0.04$ ). Dette betyr at cellenes respons på effektdosen varierer med eventuell tidligere bestråling, samtidig som det viser at man har en synergistisk effekt på denne parameteren av priming og effektdosen.

Hypotese:	P-verdi
Gir effektdose økt cellemigrasjon for uprimede celler?	0.38
Gir effektdose økt cellemigrasjon for primede celler?	0.33
Gir priming noen endring i frekvens av migrasjoner i seg selv?	0.25
Gir priming før effektdose noen endring i frekvens av migrasjoner?	0.04

**Tabell 4.11: P-verdier fra signifikanstest som tester om det er signifikant forskjell mellom andelen cellemigrasjoner etter en priming eller en effektdose**

*P-verdier fra tosidige t-tester for cellemigrasjon ut av koloni som funksjon av priming og effektbestråling fra flere forsøk. Testens formål er å påpeke eventuell forskjell i cellemigrasjon som funksjon av de ulike bestrålingsalternativene. Tabellen er satt opp etter oppsettsmal for t-test, presentert i figur 3.4, s.33.*

Som det fremgår av tabell 4.10 kan cellemigrasjon resultere i mange alternative forløp, der flere kan bidra til økning i koloniantall. Filmobservasjonene viste at migrasjonsceller kan gi opphav til egne kolonier, samt enkeltceller som kan bli liggende udelte i bildesnippet frem til filmslutt. Hvorvidt disse cellene er i stand til å starte proliferasjon etter endt filmperiode vites ikke, men det kan ikke utelukkes ettersom cellene kan ha ligget udelte i bildesnippet en relativt kort periode. Fordi delingstiden til cellene beregnes til 30 timer, er det teoretisk mulig for disse å danne selvstendige kolonier innen  $t = 14$  dager ved kun å dele seg fra  $t = 7$  dager, det vil si etter endt filmperiode. For å beregne mulig økning i koloniantall som følge av dette beregnes andelen potensielle udelte migrasjonsceller ved filmslutt som følge av priming og effektbestråling, ved å summere de alternativene migrasjonsforløpene som resulterer i enkeltceller, samt mindre cellekomplekser. Dette innebærer migrasjonsforløp der cellen:

- Avvises av andre kolonier/ deler seg ikke
- Danner vandrende cellekompleks (defineres i figur 4.9, s.58)
- Det er ukjent hva som skjer cellen, filmen slutter

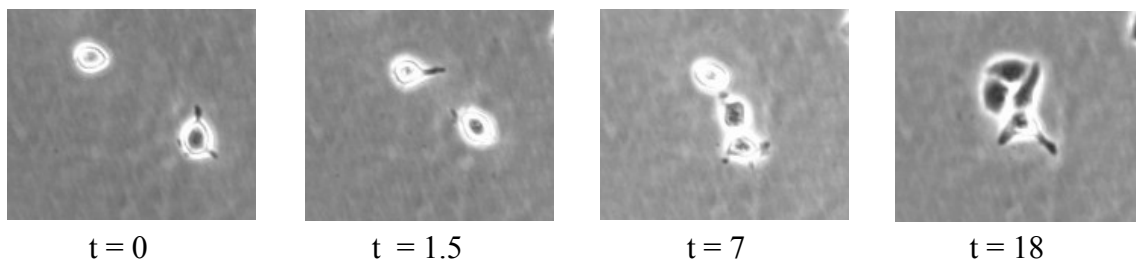
Summasjonen på bakgrunn av tabell 4.10 estimerer at andel udelte migrasjonsceller per enhet ved  $t = 0$  er henholdvis 0.9% for primede celler som ikke har fått noen effektdose og 3.2% for primede celler som har mottatt effektdose. Dette betyr at dersom de udelte migrasjonscellene starter deling etter filmslutt og utvikler seg normalt, vil dette gi størst koloniøkning hos de primede cellene som har mottatt effektdose, og dermed kunne bidra til økt "PE". Hvorvidt et slikt senarie og andre koloniøkende forløp reelt påvirker overlevelsen som følge av priming og effektbestråling kan ikke bestemmes, dette fordi det er få migrasjonsceller som følger de ulike forløpene, slik at det statistiske grunnlaget er utilstrekkelig.

Hvorvidt cellemigrasjon er en stabiliserende eller ustabiliserende effekt, samt om eventuelle stabilitetstrekk påvirkes av priming og effektbestråling er uvisst. Vi har registrert stabilitetsendringer som følge av fenomenet, men ikke funnet noen forskjell mellom de ulike cellepopulasjonene.

### 4.3.2 Hendelser som kan redusere koloniantallet

#### Cellesammenvekst

Ved cellesammenvekst danner to eller flere klonogene enheter en felles koloni ved enten å migrere eller smelte sammen. Kolonier med opphav fra sammenvokste enheter trenger ikke nødvendigvis å medføre en reell reduksjon i koloniantallet, ettersom de kan bestå av celler fra samme utsådde enhet som kan ha delt seg før filmen ble startet.



**Figur 4.8: Cellesammenvekst**

*Bildeserien viser hendelsesforløpet for en cellesammenvvekst der to klonogene startenheter smelter sammen. Tidsaksen angir tiden i timer mellom de ulike hendelsene.*

Sammenvvekst av celleenheter ble kun observert å inntreffe i enkelte tilfeller (se observasjonsskjema i vedlegg D), noe som gjorde det vanskelig å bestemme om effekten varierte med priming og effektbestråling. Ettersom effekten inntraff sjeldent virket det lite sannsynlig at denne reduserte koloniantallet i vesentlige grad. På bakgrunn av dette ble ikke cellesammenvekst studert ytterligere.

### Cellebortfall ved mediumskift

Oversvinget over 1.0 i overlevelsesfraksjonen som observeres når effektdosen gis primede celler, trenger ikke nødvendigvis å skyldes cellulære hendelser som gir opphav til økning i koloniantall for de primede cellene som har fått en effektdose, men kan forårsakes av at primingen har indusert hendelser som resulterer i nedsatt "PE" for de primede cellene (teori 2, s.47). En hendelse som muligens kan gi opphav til slik nedsatt celleoverlevelse er cellebortfall ved mediumskift. Dersom dette er tilfellet vil det bety at den nedsatte overlevelsen ikke nødvendigvis skyldes celledød, men cellebortfall.

For å tallfeste eventuelt cellebortfall som følge av priming og effektbestråling, ble antall enkeltceller, kolonier og strengkolonier notert ved siste bildet før og første bilde etter diumskift, og andelen bortfalne celler beregnet. Mediumskiftet ble utført ved  $t = 3$  dager.

	T-47D	T-47D + 0.3 Gy	T-47D-P	T-47D-P + 0.3 Gy
<b>Siste bilde før mediumskift (ca. 15 min)</b>				
Antall enkeltceller	4.4 ± 0.9	8.0 ± 1.7	4.7 ± 0.9	5.5 ± 0.8
Antall kolonier	29.1 ± 2.0	32.0 ± 2.7	22.4 ± 2.2	25.8 ± 3.9
Antall strengkolonier	0.9 ± 0.6	1.4 ± 0.7	2.4 ± 0.8	2.8 ± 1.3
Totalt	34.4 ± 2.4	41.4 ± 4.0	29.6 ± 3.1	34.2 ± 4.8
<b>Første bilde etter mediumskift (ca. 15 min)</b>				
Antall enkeltceller	1.6 ± 0.6	3.8 ± 1.4	2.3 ± 0.7	2.8 ± 0.5
Antall kolonier	29.1 ± 2.1	31.4 ± 2.9	21.7 ± 2.6	25.5 ± 3.8
Antall strengkolonier	0.9 ± 0.7	1.4 ± 0.7	2.0 ± 0.6	2.7 ± 1.1
Totalt	31.6 ± 2.3	36.5 ± 4.2	26.0 ± 2.9	31.3 ± 4.1
<b>Andelen bortfalne enheter ved mediumskift</b>				
Andel enkeltceller	0.579 ± 0.163	0.543 ± 0.127	0.516 ± 0.149	0.426 ± 0.118
Andel kolonier	0.001 ± 0.008	0.023 ± 0.016	0.050 ± 0.035	0.010 ± 0.006
Andel strengkolonier	0.250 ± 0.250	0.100 ± 0.080	0.100 ± 0.085	0.022 ± 0.020
Totalt andel bortfalne enheter	<b>0.082 ± 0.026</b>	<b>0.126 ± 0.038</b>	<b>0.124 ± 0.019</b>	<b>0.071 ± 0.020</b>

**Tabell 4.12: Cellebortfall ved mediumskift som følge av priming og effektbestråling**

Verdiene viser andelen bortfalne enkeltceller, kolonier og strengkolonier ved siste bilde før og første bilde etter mediumskift ved  $t = 3$  dager som følge av priming- og effektdose.

Verdiene i tabell 4.12 viser at celleduksjon som følge av mediumskift hovedsaklig skyldes bortfall av ca. halvparten av enkeltcellene, noe som tyder på at enkeltceller som ligger udelte i bildet ved  $t = 3$  dager, kan ha nedsatte festeegenskaper. Om de bortfalne enkeltcellene har reduserte eller manglende proliferasjonsegenskaper er ikke målt i denne oppgaven, det er sannsynlig siden celleproliferasjonen er avhengig av binding til underlaget for igangsettelse (Alberts et al. 2002, kapittel 17, s.1022).

En interessant observasjon fra tabell 4.12 er at den totale andelen bortfalne celler etter mediumskift øker når uprimede celler gis henholdsvis effektdose (fra 0.082 til 0.126,  $p = 0.36$ ) og priming (fra 0.082 til 0.124,  $p = 0.21$ ). I tillegg observeres også nedsatt andel bortfalne celler etter mediumskift (fra 0.124 til 0.071,  $p = 0.08$ ) dersom primede celler får

effektdose. Trendene, som ikke er signifikant, ifølge t-tester i tabell 4.13, åpner for spekulasjon om cellenes festeegenskaper reduseres som følge av første bestråling uavhengig av om denne er en priming eller en effektdose, og bedres som følge av eventuell sekundærbestråling. Hvorvidt dette er reelt og om det kan bidra til den forhøyede celleoverlevelsen når effektbestråling gitt primede celler, ved å virke reduserende på overlevelsen til de primede cellene som ikke mottar effektdose (T-47D-P), drøftes i kapittel 5.3.2, s.63.

<b>Hypotese:</b>	<b>P-verdi</b>
Gir effektdose økt frekvens av bortfalne celleenheter for uprimede celler?	0.36
Gir effektdose økt frekvens av bortfalne celleenheter for primede celler?	0.08
Gir primingen i seg selv økt frekvens av bortfalne celleenheter?	0.21
Gir primingen før effektdose økt frekvens av bortfalne celleenheter?	0.26

**Tabell 4.13: P-verdier fra signifikanstest som tester om det er signifikant forskjell i andelen bortfalne celler etter mediumskift som følge av en priming eller en effektdose**

*P-verdier fra tosidig signifikanstest for andelen bortfalne celler etter mediumskift som funksjon av priming og effektbestråling fra flere forsøk. Testens formål er å påpeke eventuell forskjell i andelen bortfalne celler etter mediumskift som funksjon av de ulike bestrålingsalternativene. Tabellen er satt opp etter oppsettsmal for t-test, presentert i figur 3.4, s.33.*

Graden av cellebortfall kan være forskjellig for koloni- og filmforsøk. I forsøksoppsettene er det to forskjeller som kan innvirke på festeegenskapene, der den første er tidsintervallet frem til mediumskift. Mens mediumskift for filmforsøk utføres ved  $t = 3$  dager, utføres mediumskift for koloniforsøk ved  $t = 7$  dager. Grunnen til at denne forskjellen var nødvendig, var at celleantallet utsådd per flaske var større i filmforsøkene enn i koloniforsøkene.

Den andre forskjellen er bevegelse av celleflaskene. Ved filmforsøk beveges celleflaskene i et gjentakende mønster mellom de ulike opptaksposisjonene, mens celleflaskene for koloniforsøk ligger i ro i inkubatoren. Selv om bevegelsen i filmforsøkene er meget liten kan det ikke utelukkes at slik bevegelse medfører at noen celler over tid kan løsne fra underlaget, slik at disse skylles ut av flasken ved mediumskift. Dersom dette er tilfellet vil cellebortfallet være ulikt for film- og koloniforsøk, der koloniforsøk vil oppleve noe mindre cellebortfall. Ved å beregne celleantallet i mediumet som fjernes fra cellene under koloniforsøk kan dette kontrolleres. Denne kontrollen viste seg vanskelig å gjennomføre i praksis, ettersom det for koloniforsøk kun ble utsådd 200 celler, og at det av denne grunn var svært få bortfalne celler som følge av mediumskift.

### 4.3.3 Andre observerte cellulære hendelser

#### Strengkoloni

Strengkoloniens struktur kan tyde på at en strengkoloni er en koloni med en form for ustabilitet. Filmobservasjon avslører at koloniens ustabilitet ikke trenger være varig, men kan være alternerende. Antall strengkolonier ved filmslutt er registrert ved siste bilde, tatt ved,  $t = 7$  dager. Hvorvidt strengkoloniens stabilitet ved dette tidspunktet er midlertidig eller ikke, dvs. om stabiliteten endres etter endt film, er uvisst.

Verdier fra tabell 4.3 og 4.4 (s.45-46), viser at andelen strengkolonier ved filmslutt er høyere for primede enn for uprimede celler, uavhengig om cellene mottar effektdose ( $p = 0.131$ ;  $0.035$ , tabell 4.14) eller ikke ( $p = 0.049$ ;  $0.164$ , tabell 4.14). Samtidig observeres ingen signifikant forskjell i andel strengkolonier for uprimede celler i forsøk med og uten effektdose ( $p = 0.366$ ;  $0.356$ , tabell 4.14), hvilket tyder på at andelen strengkolonier ikke er et uttrykk for HRS.

Hvorvidt andelen strengkolonier innvirker på koloniantallet drøftes i kapittel 5.2.3 (s.64).

Hypotese:	P-verdi per bildesnitt	P-verdi per celleflaske
Gir effektdose økt frekvens av strengkolonier for uprimede celler?	0.366	0.356
Gir effektdose økt frekvens av strengkolonier for primede celler ?	0.253	0.500
Gir primingen i seg selv økt frekvens av strengkolonier?	0.049	0.164
Gir primingen før effektdose økt frekvens av strengkolonier?	0.131	0.035

**Tabell 4.14: P-verdier fra signifikanstest som tester om det er signifikant forskjell mellom andelen strengkolonier etter en priming eller en effektdose**

*P-verdier fra tosidige t-tester ved sammenligning av ønskede middelerverdier fra henholdsvis fire utvalg. Signifikanstestene ble utført for å undersøke om priming og effektbestråling påvirker andelen strengkolonier ved filmslutt,  $t = 7$  dager. Testene ble utført for andelen strengkolonier ved filmslutt per posisjon og per forsøk, der hvert forsøk inneholdt tre opptaksposisjoner. Tabellen er satt opp etter oppsettsmal for t-test, presentert i figur 3.4, s.33.*

#### Enkeltceller

Tabell 4.3 og 4.4 (s.45-46) viser at andel enkeltceller ved filmslutt,  $t = 7$  dager er langt høyere for ubestrålte celler ( $0.022$ ;  $0.024$ ) eller celler bestrålt med både priming og effektdose ( $0.05$ ;  $0.044$ ) enn om cellene eksponeres for enten en priming- ( $0.008$ ;  $0.011$ ) eller effektdose ( $0.008$ ). I dette tilfellet antyder t-testene på bildesnitt (tabell 4.15) at både priming og effektdose kan gi i nærheten av signifikante forskjeller mht andelen enkeltceller ved filmslutt (7 dager).



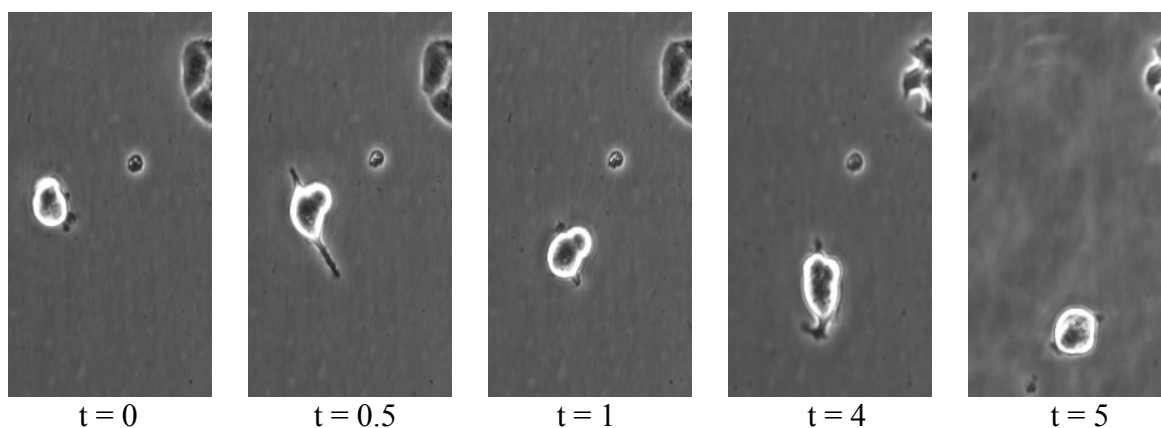
Hypotese:	P-verdi per bildesnitt	P-verdi per celleflaske
Gir effektdose økt frekvens av enkeltceller for uprimede celler?	0.059	0.100
Gir effektdose økt frekvens av enkeltceller for primede celler?	0.031	0.121
Gir primingen i seg selv økt frekvens av enkeltceller?	0.081	0.144
Gir primingen før effektdose i seg selv økt frekvens av enkeltceller?	0.020	0.096

**Tabell 4.15: P-verdier fra signifikanstest som tester om det er signifikant forskjell mellom andelen enkeltceller etter en priming eller en effektdose**

P-verdier fra tosidige t-tester ved sammenligning av ønskede middelerverdier fra henholdsvis fire utvalg. Signifikanstestene ble utført for å undersøke om priming og poststråling påvirker andelen enkeltceller ved filmslutt,  $t = 7$  dager. Testene ble utført for andelen strengkolonier ved filmslutt per posisjon og per forsøk, der hvert forsøk inneholdt tre opptaksposisjoner. Tabellen er satt opp etter oppsettsmal for t-test, presentert i figur 3.4, s.33.

### Vandrende cellekompleks

Et vandrende cellekompleks er en eller flere sammenhengende eller nærmest sammenfiltrerede celler, som viser betydelig vandring og som i noen tilfeller ser ut til å søke mot andre kolonier.



**Figur 4.9: Vandrende cellekompleks**

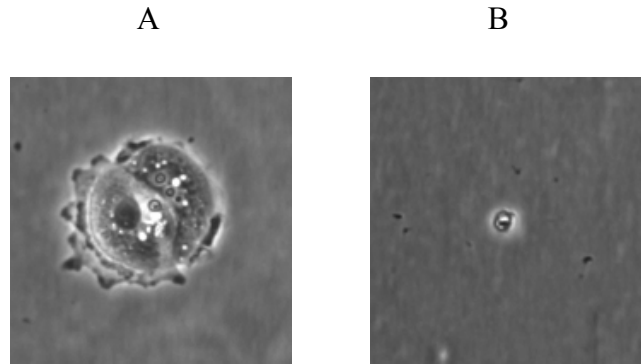
Bildeserien viser en ansamling celler som beveger seg langs substratum. Vandringen observeres ut fra bildet å være av størrelsesorden 3 cellelengder. Tidsaksen angir tiden i timer mellom de ulike hendelsene.

Filmobservasjon viste svært få vandrende cellekomplekser.

### **Celledød - apoptose og nekrose**

Ved filmobservasjon har det blitt observert en rekke celler i bildesnittene som ikke klarer å dele seg, eller som kun klarer å gjennomføre en eller to delinger. Noen av disse skylles ut av bildesnippet ved mediumskift, mens andre blir liggende udelte til filmslutt.

Verken apoptotisk eller nekrotisk død (definert i 2.3.1, s.18) har blitt observert i filmene, men det har blitt registrert noen celler som har mangedoblet sin størrelse uten å klare og dele seg. Både celler lik de i figur 4.10A og B har blitt observert å skylles ut av bildesnippet ved mediumskift, men antallet slike celler av type A er neglisjerbart.



**Figur 4.10: Eksempler på celler med manglende klonogenitet**

*Bilde A viser en celle som har mangedoblet sin størrelse uten å klare og dele seg, mens bilde B viser en udelte enkeltcelle som har krympet i størrelse. Celler lik cellen i bilde B observeres ofte å skylles ut av bildesnippet ved mediumskift, eller å bli liggende udelte til filmslutt. De observeres aldri i denne oppgaven å starte celledeling.*

## 5 Diskusjon

### 5.1 Koloniforsøk

#### 5.1.1 Koloniforsøk med uprimede T-47D-celler

Røntgenbestråling av villtype (uprimede) T-47D-celler (figur 4.1, s.39) viste at cellene i denne oppgaven uttrykte HRS dersom effektdosen var under 0.5 Gy, og at HRS-uttrykket var størst etter 0.3 Gy effektdose. Disse observasjonene samstemmer med tidligere undersøkelser av Edin med både røntgen- og [ $^{60}\text{Co}$ ]- $\gamma$ -stråling (se tilpasning til IR-modellen i figur 4.1). Koloniforsøkene i denne oppgaven viser noe lavere uttrykk av HRS (0.91) etter en 0.3 Gy effektdose enn Edin sine eksperimenter med røntgenstråling (0.88), men siden vi i denne oppgaven kun har to vellykkede koloniforsøk har vi ikke statistisk grunnlag til å si noe med sikkerhet.

En ting som derimot kan sies relativt sikkert er at koloniforsøkene på T-47D-celler i denne oppgaven viser betydelig høyere overlevelsesfraksjon (0.91) etter 0.3 Gy røntgenstråling enn tilsvarende studie gjort med [ $^{60}\text{Co}$ ]- $\gamma$ -stråling (0.80), se figur 5.1 (s.67). Årsaken til at HRS-uttrykket er større for [ $^{60}\text{Co}$ ]- $\gamma$ -stråling enn for røntgenbestrålte celler er ukjent, men ettersom eneste som skiller stråletypene fra hverandre er energifordelingen, kan dette tyde på at en energifordeling med høyt bidrag av lav energi stråling og dermed høyere LET gir mindre uttrykk av HRS. En annen mulig forklaring på forskjellen i HRS-uttrykk vil introduseres i kapittel 5.3.

#### 5.1.2 Koloniforsøk med T-47D-celler primet med lav doserate (LDR) bestråling

Koloniforsøk i figur 4.2 med celler primet med 0.3 Gy LDR opp til 109 uker før viste bortfall av HRS med celleoverlevelser over 1.0 og effektdoser under 0.5 Gy. Oversvinget er størst etter 0.3 Gy effektbestråling, der det er oppmot 1.05, dvs. 5% over 100% celleoverlevelse. Utført t-test i tabell 4.2 (s.42) viser at den initielle helningsvinkelen ( $6.70^\circ \pm 2.64^\circ$ ) er signifikant større ( $p = 0.0015$ ) enn  $0^\circ$  helning, noe som betyr at det målte oversvinget over 1 i overlevelsesfraksjon er signifikant.

Det induserte bortfallet av HRS ses i forskjellen i overlevelsesfraksjon for primede og uprimede celler som har mottatt en 0.3 Gy effektdose. I koloniforsøkene utført i denne oppgaven ble overlevelsesfraksjonen for uprimede- og primede celler funnet til henholdsvis 0.91 (figur 4.1, s.39) og 1.05 (figur 4.2B, s. 41) dersom disse mottok en 0.3 Gy effektbestråling. Dette betyr at økningen i overlevelsesfraksjon som følge av en primingdose gitt før effektdosen (indusert bortfall av HRS) tilsvarer  $\sim 15\%$ .

## 5.2 Filmforsøk

I filmforsøk målte vi en verdi for "plating efficiency" mellom 74% og 91% avhengig av de ulike bestrålingalternativene (tabell 4.3 og 4.4, s.45-46). Samtidig observerte vi at noen kolonier dannes ut fra andre utgangspunkter enn en utsådd startenheter. Disse koloniene kan muligens bidra til å forklare oversvinget over 1 i overlevelsesfraksjoner dersom de er mer uttalt for primede celler etter effektbestråling enn for primede celler uten effektbestråling. Samtidig kan det bidra til å maskere noe av effekten av HRS dersom det er mer uttalt for uprimede celler etter effektbestråling enn uten effektbestråling.

Ved filmforsøk (tabell 4.3-4.4, s.45-46) ble både HRS-uttrykket og oversvinget etter en 0.3 Gy effektbestråling funnet større enn i koloniforsøkene (figur 4.1 s.39; figur 4.2B s.41). Ved koloniforsøk overlevelsesfraksjonen ved HRS-uttrykket beregnet til 0.91, mens det for filmforsøk kun ble målt til 0.89. Samtidig var overlevelsesfraksjonen ved oversvinget 1.08 i filmforsøk, mens det i koloniforsøk kun ble målt opp til 1.05. Det at filmforsøkene konsekvent gir høyere målt uttrykk av både HRS og oversving kan tyde på at koloniforsøkene underestimerer effektene.

I dette kapittelet søkes det å bestemme den reelle overlevelsesfraksjonen for uprimede og LDR-primede celler etter en 0.3 Gy effektbestråling og det ble i kapittel 4 kartlagt mulige effekter som kunne påvirke målt "PE". I dette kapittelet skal vi se nærmere på disse effektene og prøve å bestemme om de reelt påvirker "PE" og hvor stor den eventuelle påvirkningen er. Ut fra resultaterne vil den målte "PE" bli korrigert og det vil undersøkes hvordan en slik korreksjon påvirker uttrykket av oversving og HRS. I kapittel 5.3 og 5.4 vil mulige forklaringer av henholdsvis HRS og oversving bli diskutert ut fra informasjon gjort tilgjengelig i oppgaven.

### 5.2.1 Dublettdeling, kolonideling og cellemigrasjon

Det har blitt observert tre hendelser som kan gi økning i koloniantall (PE); dublettdeling, kolonideling og cellemigrasjon. Hyppigheten av de ulike hendelsene ser ut til å variere noe som følge av priming og effektbestråling, der primede celler ser ut til å ha en høyere hendelseshyppighet uavhengig om de mottar en 0.3 Gy effektdose eller ikke (tabell 4.6, s.49; tabell 4.8, s.51; tabell 4.10, s.52). Cellemigrasjon er det fenomenet som generelt ser ut til å inntreffe hyppigst (tabell 4.10), men som gir lavest økning i koloniantall (PE) (tabell 5.1). Dublett- og kolonideling ser ut til å inntreffe noe sjeldnere (tabell 4.6 og 4.8), men å gi større økning i koloniantallet (PE)(tabell 5.1).

For å beregne av hvor mange klonogene enheter ved  $t = 0$  som gir opphav til flere kolonier ved de nevnte hendelsene, summeres andelen celler som gir opphav til flere kolonier, ved dublettdeling (tabell 4.6), kolonideling (tabell 4.8) og cellemigrasjon (tabell 4.10), som følge av priming- eller effektbestråling (tabell 5.1).

Verdiene i tabell 5.1 viser lavere andel startenheter som gir opphav til flere kolonier for ubestrålte celler (0.019) enn for celler som har mottatt bestråling, uavhengig om denne

ble gitt som priming- (0.076) eller effektbestråling (0.05), eller begge deler (0.066). Hvor mange av de klonogene cellene som gir opphav til flere kolonier er vanskelig å si sikkert, ettersom det er store usikkerheter tilknyttet verdiene i tabell 5.1. Dersom vi allikevel går ut fra at verdiene i tabell 5.1 gjengir den reelle trenden, kan vi ikke utelukke en overestimering opp mot 7.6% for de bestrålte cellene og opp mot 2% for de ubestrålte cellene.

	T-47D	T-47D + 0.3 Gy	T-47D-P	T-47D-P + 0.3 Gy
<b>Andel startenheter som gir opphav til flere kolonier ved:</b>				
Dublettdeling	0.008 ± 0.004	0.023 ± 0.012	0.033 ± 0.008	0.018 ± 0.011
Kolonideling	0.011 ± 0.008	0.022 ± 0.007	0.039 ± 0.022	0.035 ± 0.008
Cellemigrasjon	0.000 ± 0.000	0.005 ± 0.003	0.004 ± 0.004	0.013 ± 0.006
Totalt	0.019 ± 0.009	0.050 ± 0.014	0.076 ± 0.024	0.066 ± 0.015

**Tabell 5.1: Andelen klonogene celler som danner flere enn en koloni ved dublettdeling, kolonideling og cellemigrasjon**

Verdiene presenterer den andelen enheter ved  $t = 0$  som danner flere kolonier ved dublettdeling (tabell 4.6, s.49), kolonideling (tabell 4.8, s.51) og cellemigrasjon (tabell 4.10, s.52). Ettersom dublettdeling og kolonideling gir opphav til to selvstendige kolonienheter vil kun halvparten av de cellene som bidrar til to kolonier virke økende på celleoverlevelsen. Dette har blitt tatt hensyn til i skjemaet ved å halvere de beregnede andelene, samt "standard error" for disse fenomenene. En slik tilnærming vil gi noe feil ettersom begge de to celledelene må danne selvstendige kolonier for at vi skal få en koloniøkende effekt. Total "standard error" ble beregnet etter ligning 3.13 (s.38).

Cellemigrasjon vil også kunne resultere i enkeltceller som kan bli liggende udelte i bildesnittet ved filmslutt. Hvorvidt disse cellene kan starte proliferasjon etter endt filmopptak er ukjent, men kan ikke utelukkes, spesielt ettersom migrasjonscellene kan ha ligget udelte en relativt kort periode. Ettersom delingstiden til T-47D- og T-47D-P-cellene er henholdsvis ca. 30 og 27 timer i disse eksperimentene er det teoretisk mulig for disse cellene å danne selvstendige kolonier innen  $t = 14$  dager ved kun å dele seg etter endt filmopptak, dvs. fra  $t = 7$  dager. Dersom enkeltcellene starter proliferasjon etter endt filming vil dette kunne medføre ytterligere overestimering av "PE" enn hva som fremgår av tabell 5.1

Det er av denne grunn interessant å se at tabell 4.3 og 4.4 (s.45-46) viser langt høyere andel enkeltceller ved filmslutt ( $t = 7$  dager) hos de ubestrålte cellene (0.022; 0.024), og hos cellene som har mottatt både priming og effektbestråling (0.050; 0.044), enn hos celler som kun har mottatt priming (0.008; 0.011) eller effektdose (0.008). Dette betyr at dersom cellene kan starte deling vil dette resultere i størst økning i koloniantallet hos de ubestrålte cellene (T-47D), og hos de priming- og effektbestrålte cellene (T-47D-P + 0.3Gy), hvilket jo vil bidra til overuttrykk av henholdsvis HRS og oversving over 1 i overlevelsesfraksjon i den målte celleoverlevelsen, dersom cellene er migrasjonsceller.

### **Stabilitet dublettdeling, kolonideling og cellemigrasjon**

Det er velkjent at kreftceller har en viss genomisk ustabilitet (se kapittel 5.2.4, s.64). Undersøkelser av T-47D-celler har for eksempel vist at cellene er aneuploide, dvs. de har flere enn normalt antall kromosomer (Keydar et al. 1979).

Hyppighetene for dublettdeling (tabell 4.6, s.49), kolonideling (tabell 4.8, s.51) og cellemigrasjon (tabell 4.10, s.52) øker dersom ubestrålte celler (T-47D) gis enten en priming eller effektdose. Hvorvidt fenomenene er uttrykk for en eller annen form for ustabilitet i cellene er uvisst, men dersom dette er tilfellet kan hyppighetsøkningene etter bestråling være et symptom på at stråling kan øke ustabiliteten i cellene. Dersom de primede cellene derimot gis en effektdose observeres noe nedgang i andelen dublettdeling, kolonideling og cellemigrasjon. Dette kan indikere at effektdosen stabiliserer

### **5.2.2 Cellebortfall ved mediumskift**

Filmobservasjon har vist at celler og kolonier kan løsne og forlate bildesnippet under mediumskift. Verdiene i tabell 4.12 (s.55) tyder på at andelen bortfalle celler er høyere for celler som har mottatt bestråling, uavhengig om denne er en priming (0.124) eller effektdose (0.126), enn for ubestrålte celler (0.082) eller celler som mottar både priming og effektbestråling (0.071). Variasjonene åpner for spekulasjon om strålingen påvirker festeevnen til cellene, og om dette igjen kan være et uttrykk for apoptose, ettersom apoptose blant annet initieres av at cellen bryter sine bindinger til naboceller og underlaget (Karp 2002).

I filmene observeres tegn på at cellene er apoptotiske, men at prosessen avbrytes, noe som retter mistanke mot en ufullstendig apoptoseinitiering. p53-funksjonen, som er defekt hos T-47D-cellene, spiller en nøkkelrolle i initiering av apoptose (Alberts et al. 2002, kapittel 17, s.1008). En mulig løsning kan være at cellene klargjøres for apoptose, men at de grunnet mutasjonen ikke klarer å gjennomføre prosessen. Skadeomfanget er likevel for stort til at de klarer å gjennomføre normal deling, noe som medfører at de blir liggende udelte i bildesnippet eller stanser delingen. En annen forklaring kan være at det vi observerer ikke er et uttrykk for apoptose, men en annen effekt som hindrer den normale celledelingen, eller at cellene dør i mitosen uten å initiere apoptose.

Det kan med nogenlunde sikkerhet slås fast at disse cellene ikke er normalt klonogene, hvilket betyr at de ikke ville påvirket celleoverlevelsen dersom de hadde blitt værende i bildesnippet. Cellene ser heller ikke ut til å påvirke andre kolonier i betydningsfull grad i de tilfeller der de migrerer inn i kolonier.

### **Kryssbordbevegelse og mediumskift**

I kapittel 4.3.2 (s.55) ble det påpekt at kryssbordbevegelse med tiden muligens kan løsne celler fra underlaget, og det kan ikke utelukkes at noen av de løsrevne cellene kan være klonogene. Trypsineringen vil her kunne spille en rolle ettersom det kan ventes at celler

som utsettes for hard trypsinering kan ha lengre festetid enn celler som utsettes for mild trypsinering. Ettersom trypsineringen vil variere noe fra forsøk til forsøk kan dette gi opphav til ulikt feste til underlaget ved filmstart. Kryssbordbevegelsen kan videre forsterke denne forskjellen ved å løsne celler med svakt feste til underlaget.

For å eliminere mulig bortfall av klonogene celler ble celleflaskene undersøkt i mikroskop før filmstart for å sikre feste, i tillegg til at flaskene ble behandlet med forsiktighet. I registrering av antall startenheter ble kun de cellene med observert feste registrert. Ut fra dette kan det antas at bortfall av klonogene celler holdes til et minimum slik at cellebortfallet ved mediumskift ikke i betydelig grad vil påvirke celleoverlevelsen.

Denne antagelsen støttes av undersøkelser utført av Edin (upublisert, personlig meddelelse), der det ble undersøkt om mediumskift innvirker på celleoverlevelse, ved å sammenligne overlevelsen til celler som har, med de som ikke har mottatt mediumskift, ved ulike stråledoser (0, 0.3 og 2 Gy). Undersøkelsene viste ingen cellebortfall i de flasker som fikk skiftet medium i forhold til de uten mediumskift, verken for kontrollcellene (T-47D) eller de bestrålte cellene.

### **5.2.3 Strengkolonier**

I kapittel 4.3.3 (s.57) ble det forslått at en strengkoloni er en koloni med en form for ustabilitet. Tabell 4.3 og 4.4 (s. 45-46) viser høyere andelen strengkolonier ved filmslutt ( $t = 7$  dager) for primede (T-47D-P) enn for uprimede celler (T-47D), uavhengig om cellene mottok en 0.3 Gy effektdose eller ikke. Disse observasjonene peker i retning av at det er LDR-primingen som introduserer strengkoloniene. Tabell 4.3 og 4.4 viser også noe nedgang i andelen strengkolonier dersom de primede cellene gis en effektdose (fra 0.127 til 0.097; fra 0.122 til 0.102), hvilket åpner for spekulasjon om den etterfølgende effektdosen virker stabiliserende på cellene. Dette er usikkert, men uansett virker det lite trolig at strengkolonier er årsaken til oversvinget over 1 i overlevelsesfraksjon for primede celler. Tallene utelukker også at de påvirker overlevelsesfraksjonen i HRS-området av effektdoser for villtypen (uprimede) T-47D-celler.

### **5.2.4 Genomisk ustabilitet**

Genomisk ustabilitet er definert som unormalt høye rater av genetiske endringer i avkom fra en celle, som følge av en genetisk endring i denne. Både lav og høy LET ioniserende stråling ( $\alpha$ ,  $\gamma$  og rtg) har blitt vist å indusere genomisk ustabilitet (Holmberg 1998; Bartolletto et al. 2001; Mothersill et al. 2000; Little et al. 1997, Ponnaiya et al. 2004), samt forsinket reproduktiv død og forsinkede letale mutasjoner i en rekke mammae celler (Gorgojo og Little 1989; Seymour et al. 1986; Chang og Little 1991; Fitzek og Trott 1993; Suzuki et al. 1998). Genomisk ustabilitet har blitt observert i flere kreftceller og blitt foreslått å være en drivkraft bak malign transformasjon (Lengauer 1998; Gollin 2004).

Det kan ikke utelukkes at genomisk ustabilitet kan påvirke celleoverlevelsene i denne oppgaven, ved at LDR-primingen induserer permanente skader i cellene som gjør disse

ustabile. Ettersom det ikke kan ventes at vi med det blotte øyet kan skille genomisk ustabile celler fra celler med stabilt genom, har vi i denne oppgaven ingen forutsetning til å trekke konklusjoner om genomisk ustabilitet reelt påvirker celleoverlevelsen.

### 5.2.5 Reell "plating efficiency"

Resultatene i denne oppgaven peker i retning av at den reelle "PE" vil være noe lavere enn den målte "PE" i alle flasker uansett bestråling, fordi noen kolonier dannes ut fra andre utgangspunkter enn en utsådd startenheter. Overestimeringen skyldes nesten utelukkende klonogene enheter som ved å gjennomgå dublettdeling, kolonideling eller cellemigrasjon, gir opphav til flere kolonier.

Den reelle "PE" kan beregnes ved å subtrahere den målte verdien (i tabell 4.3 og tabell 4.4) med andelen klonogene enheter som gir opphav til flere enn 1 koloni (tabell 5.1). Beregningene er gjort både per bildesnitt (tabell 4.3) og per celleflaske (tabell 4.4), der hver celleflaske består av tre bildesnitt, ettersom det ikke var innlysende hvilken metode som er den mest korrekte.

	T-47D	T-47D + 0.3 Gy	T-47D-P	T-47D-P + 0.3 Gy
Målt "PE" (tabell 4.3)	0.848 ± 0.185	0.753 ± 0.206	0.839 ± 0.188	0.910 ± 0.214
Andel kolonidannende enheter som danner flere enn en koloni (tabell 5.1)	0.019 ± 0.009	0.050 ± 0.014	0.076 ± 0.024	0.066 ± 0.015
<b>Reell "PE"</b>	<b>0.829 ± 0.185</b>	<b>0.703 ± 0.206</b>	<b>0.763 ± 0.189</b>	<b>0.844 ± 0.215</b>
Målt "PE" (tabell 4.4)	0.827 ± 0.011	0.740 ± 0.018	0.834 ± 0.016	0.902 ± 0.009
Andel kolonidannende enheter som danner flere enn en koloni (tabell 5.1)	0.019 ± 0.009	0.050 ± 0.014	0.076 ± 0.024	0.066 ± 0.015
<b>Reell PE</b>	<b>0.808 ± 0.014</b>	<b>0.690 ± 0.023</b>	<b>0.758 ± 0.029</b>	<b>0.836 ± 0.017</b>

#### **Tabell 5.2: Beregning av reell "plating efficiency" som følge av priming og effektbestråling**

Den reelle "PE" ble beregnet ved å subtrahere målte celleoverlevelsen per bildesnitt (tabell 4.3, s. 45) og per celleflaske (tabell 4.4, s.46), der hver celleflaske består av tre bildesnitt, fra utførte filmforsøk, med andelen kolonidannende enheter som danner flere enn 1 koloni (tabell 5.1, s.62). Total "standard error" ble beregnet etter ligning 3.13 (s.38).

Tabell 5.2 viser at den observerte "PE" er høyere enn den reelle for alle gruppene. Forskjellen er imidlertid mindre for ubestrålte celler (2.3%; 2.2%), enn for celler som har mottatt bestråling, uavhengig om denne gis som enten priming (9.1%) eller effektdose (6.6%; 6.2%) eller begge deler (7.3%).

Korreksjonen av den målte "PE" resulterte i lavere reell "PE", dette fordi vi har flere kolonier i flasken som dannes ut fra andre utgangspunkt enn en utsådd startenheter. Hva denne korreksjonen betyr for celleresponsen til uprimede og primede celler som følge av en 0.3 Gy effektbestråling vises i tabell 5.3. Her gjengis overlevelseshfraksjonene fra koloniforsøk (se figur 4.1 og 4.2), samt ukorrigerte og korrigerte overlevelseshfraksjoner



fra filmforsøk. Ved filmforsøk ble overlevelseshfraksjonene beregnet for både per bildesnitt (tabell 4.3, s.45) og per celleflaske (tabell 4.4, s. 46).

Overlevelseshfraksjoner etter 0.3 Gy effektbestråling		T-47D	T-47D-P
Ukorrigert overlevelseshfraksjon:	Koloniforsøk	0.91	1.05
	Filmforsøk (tabell 4.3)	0.89	1.08
	Filmforsøk (tabell 4.4)	0.89	1.08
Korrigert overlevelseshfraksjon:	Filmforsøk (tabell 4.3)	0.85	1.11
	Filmforsøk (tabell 4.4)	0.85	1.10

**Tabell 5.3: Korrigerte og ukorrigerte overlevelseshfraksjonene for film- og koloniforsøk.**

Verdiene viser beregnede overlevelseshfraksjoner for henholdsvis koloni- og filmforsøk. Overlevelseshfraksjonene for koloniforsøk er fra figur 4.1 (T-47D) og figur 4.2B (T-47D-P) (s.39 og 41), mens overlevelseshfraksjonene for filmforsøk er beregnet ut fra målt og reell "PE" i tabell 5.2. Den ukorrigerte og korrigerte overlevelseshfraksjonen gjengir forholdet med og uten 0.3 Gy effektbestråling for henholdsvis målt og reell "PE". Reell "PE" beregnes (i tabell 5.3) ved å korrigere den målte "PE" (fra tabell 4.3 og 4.4) med andelen klonogene startenheter som danner flere enn 1 koloni (fra tabell 5.1).

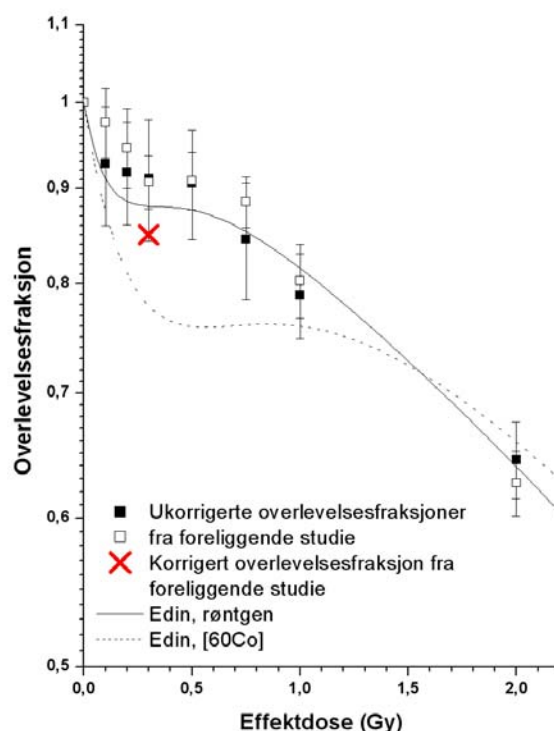
Verdiene i tabell 5.3 viser at de korrigerte overlevelseshfraksjonene (beregnet fra reell PE), gir høyere uttrykk av både HRS og oversving enn de ukorrigerte overlevelseshfraksjonene for koloni- og filmforsøk (beregnet fra målt PE). Dette tyder på at effektene ikke kan forklares ut fra observasjonene i filmene, men at disse tvert imot maskerer deler av effektene, slik at effektens virkning på cellene er sterkere enn antatt.

Mulige mekanismer bak HRS og oversving, samt forskjellen mellom disse (indusert bortfallet av HRS), vil drøftes i kapittel 5.3 og 5.4.

### 5.3 "Plating efficiency" for uprimede T-47D-celler

Målt "PE" i koloniforsøk (figur 4.1, s.39) og filmforsøk (tabell 4.3-4.4, s.45-46) viser at T-47D-cellene uttrykker HRS dersom de eksponeres for en 0.3 Gy HDR-effektdose. Reduksjonen i målt "PE" for filmforsøk, ( $p = 0.326$ ;  $0.345$ , tabell 4.3), ble beregnet til  $\sim 11\%$ , noe som stemmer godt med overlevelseshreduksjonen i koloniforsøk ( $\sim 9\%$ ) etter en 0.3 Gy effektdose (figur 4.1).

Data i tabell 5.3 viser at overlevelseshfraksjonen er lavere når den beregnes fra reell "PE" (0.85) enn om den beregnes fra målt "PE", for både film- (0.89) og koloniforsøk (0.91). Figur 5.1 viser den korrigerte overlevelseshfraksjonen fra filmforsøk etter en 0.3 Gy effektbestråling (se inntegnet punkt,  $\times$ ), plottet med ukorrigerte gjennomsnittlige overlevelseshfraksjoner fra koloniforsøk:



**Figur 5.1: Overlevelsesfraksjoner som funksjon av effektdose for T-47D-celler**

Figuren viser ukorrigerede overlevelsesfraksjoner for to forsøk T-47D-celler (■/□) som følge av effektdoser, samt korrigert overlevelsesfraksjon (×) beregnet fra filmobservasjon etter en 0.3 Gy effektdose. Effektdosen ble levert ved 30 Gy/time (HDR) røntgenstråling. Overlevelsesfraksjonene er plottet mot en tilpasning til IR-modellen (kapittel 2.3.4, s.21) ved minste kvadraters metode etter eksperimenter med røntgen- (—) [<sup>60</sup>Co]-γ-stråling (····) av Edin (upublisert, personlig meddelelse; Edin et al. 2007).

Korreksjon av målt "PE" medfører økt uttrykk av HRS (se. × i figur 5.1), hvilket betyr at de koloniøkende effektene ikke kan forklare uttrykk av HRS, men at disse tvert imot maskerer deler av HRS-uttrykket.

### 5.3.1 HRS

Effekter som kan forklare uttrykk av HRS har ikke blitt observert ved "time-lapse"-film.

Studier på HRS har fremmet hypotese om at HRS er et uttrykk for stråleskadede G<sub>2</sub>-celler som unnslipper det transiente G<sub>2</sub>/M-kontrollpunktet og initierer apoptose (Krueger et al. 2007). I filmene ble det observert celler som ikke var normalt klonogene. Noen av disse ble skylt ut ved mediumskift, mens de resterende cellene ble liggende i bildesnittet til filmslutt. I delkapittel 5.2.2 (s.63) ble det foreslått at dette var celler som ikke klarte å initiere apoptose, mest sannsynlig grunnet defekt p53-funksjon. Ettersom cellene har flere signaleringsveier for å initiere apoptose, er det mulig at defekt p53-funksjon alene ikke

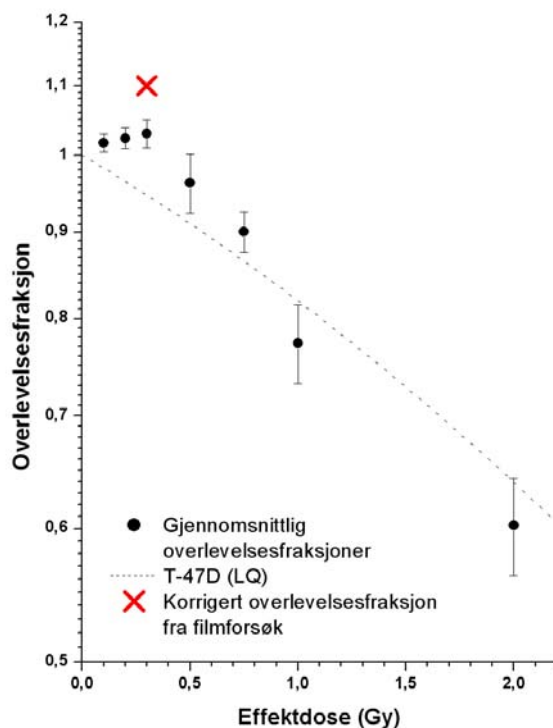
kan hindre prosessen, men observasjonene tyder på at det er andre faktorer som hindrer delingen og at cellene ikke klarer å fullføre mitosen.

Overlevelseshfraksjoner etter røntgenbestrålinger i denne oppgaven, i kombinasjon med lignende studier med  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -stråling av Edin et al. (2007), viser at størrelsen på det observerte HRS-uttrykket ved koloniforsøk er ulikt om cellene effektdosen leveres ved røntgen eller  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -stråling. Årsaken til dette er ukjent, men ettersom det eneste som skiller stråletypene er energifordeling, kan dette tyde på at høyer fotonenergier gir høyere uttrykk av HRS enn lave. En annen mulighet er at ulike energier gir opphav til ulik grad av faktorer som påvirker målt "PE" (som dublettdeling, kolonideling og cellemigrasjon), slik at effektene maskeres i ulik grad ved de to forsøksoppsettene. Observasjoner i figur 5.2 viser at den korrigerte overlevelseshfraksjonen nærmer seg tilpasningen til IR-modellen for T-47D-celler bestrålt med  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -stråling, noe som kan tyde på at de reelle overlevelseshfraksjonene for de to stråletypene er likere enn hva de målte overlevelseshfraksjonene tilsier. Det ville av denne grunn vært interessant å utføre filmforsøk på  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -bestrålte celler, og se hvordan en eventuell korreksjon ville påvirket HRS-uttrykket. Lignende studier på primede T-47D-celler vil og være av interesse for å se hvordan en eventuell korreksjon ville påvirker oversvinget over 1.0 i overlevelseshfraksjon..

## **5.4 "Plating efficiency" i celler primet med lav doserate (LDR) bestråling**

Koloniforsøk (figur 4.2, s.41) og filmforsøk (tabell 5.2, s.65) i denne oppgaven viste bortfall av HRS og økning i celleoverlevelse for celler som mottok 0.3 Gy primingdose ved lav doserate (LDR) bestråling 17.08.2005. Dette betyr at HRS fortsatt ikke er gjenfunnet 109 uker etter primingen, noe som støtter Edin sitt studie og hypotese om at effekten muligens induseres permanent (Edin et al. 2007; 2008).

Data i tabell 5.3 viser at overlevelseshfraksjonen er høyere når den beregnes fra reell "PE" (1.11; 1.10) enn om den beregnes fra målt "PE", for både film- (1.08) og koloniforsøk (1.05). Figur 5.2 viser den korrigerte overlevelseshfraksjonen fra filmforsøk etter en 0.3 Gy effektbestråling (se inntegnet punkt,  $\times$ ), plottet mot ukorrigerte gjennomsnittlige overlevelseshfraksjoner fra koloniforsøk:



**Figur 5.2: Korrigert overlevelsesfraksjon ved filmforsøk plottet mot gjennomsnittlige overlevelsesfraksjoner for primede T-47D-celler som funksjon av effektdose**

Figuren viser gjennomsnittlig overlevelsesfraksjoner for syv forsøk med T-47D-celler (●) eksponert med en 0.3 Gy LDR primingdose før en effektdoser, samt korrigert overlevelsesfraksjon (X) beregnet fra filmobservasjon (tabell 4.3) etter en 0.3 Gy effektdose. Primingdosen ( $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -stråling) ble levert 17.08.2005 av Edin ved lav doserate (LDR) 0.3 Gy/time, mens effektdosen (røntgen) ble levert inntil 109 uker etter primingen ved høy doserate (HDR) 30 Gy/time. Overlevelsesfraksjonene er plottet mot en tilpasning ved minste kvadraters metode til LQ-modellen (kapittel 2.3.2, s.18) for effektbestrålte, dvs. uprimede T-47D-celler, etter eksperimenter utført av Edin (upublisert, personlig meddelelse).

#### 5.4.1 Oversving over 1.0 i overlevelsesfraksjon

Den økte overlevelsesfraksjonen som følge av korreksjon betyr at de koloniøkende faktorene ikke kan forklare oversvinget over 1.0 i overlevelsesfraksjon. Effektene ser tvert imot ut til å maskere deler av oversvinget. Dette medfører at de to arbeidsteoriene fra kapittel 4.2.1 (teori 1-2, s.47) ikke kan forklare oversvinget over 1.0 i overlevelsesfraksjon:

**Den første teorien** foreslo at oversvinget kom av effekter som virket økende på "PE" og at disse virket sterkere på primede celler som mottok en effektbestråling (T-47D-P + 0.3 Gy) enn for de som ikke gjorde dette (T-47D-P). Denne teorien kan som sagt ikke forklare oversvinget, selv om det ble observert både dublettdeling, kolonideling og cellemigrasjon, som alle virker økende på "PE" i alle cellepopulasjoner.

**Den andre teorien** foreslo at oversvinget kom av effekter som reduserte "PE" og at disse virket sterkere på de primede cellene som ikke mottok effektdose (T-47D-P) enn for de som gjorde dette (T-47D-P + 0.3 Gy). Denne teorien kan heller ikke forklare oversvinget ettersom det tvert imot observeres flere celler enn det er kolonidannende enheter i begge gruppene, noe som medførte at "PE" måtte korrigeres nedover. En effekt som virket reduserende på "PE" ble likevel observert (cellesammenvekst, figur 4.8, s.54), men effekten inntraff for sjeldent til å gi noen vesentlig reduksjon i koloniantallet

Det at de observerte effektene så ut til å maskere deler av oversvinget var meget overraskende ettersom det avskrev mulighetene for at teori 1 og 2 kunne forklare oversvinget. Det er også meget overraskende at filmobservasjon ikke har bragt oss nærmere forklaringen på oversvinget.

Så hva kan da oversvinget da over 1.0 i overlevelsesfraksjon skyldes. Hvordan kan effektbestrålingen medføre økt celleoverlevelse. Gjennom diskusjon med veiledere har vi kommet fram til to mulige hypoteser som kan forklare oversvinget:

Hypotese 1:        Effektdosen øker T-47D-P-cellenes feste til underlaget

Hypotese 2:        Effektdosen stimulerer T-47D-P-celler ut av  $G_0$

#### **Effektdosen øker cellenes feste til underlaget.**

Dersom det har seg slik at effektdosen øker festeevnen til cellene, bør data i denne oppgaven vise lavere bortfall av klonogene enheter for primede celler som har mottatt en effektdose enn for primede celler som ikke har dette. Ettersom de bortfallene enkeltcellene i kapittel 5.2.2 (s.63) ble anslått å ikke være klonogene, er det kun bortfall av kolonier og strengkolonier som vil kunne indikere en effektbestrålingen øker cellenes feste til underlaget. Tabell 4.12 (s.55) viser redusert bortfall av både andelen kolonier (fra 0.05 til 0.01) og strengkolonier (fra 0.100 til 0.022) når en effektdose gis primede celler, men om reduksjonen er tilstrekkelig til å kunne forklare oversvinget over 1.0 i overlevelsesfraksjon er usikkert. For å undersøke dette ble det i tabell 5.4 beregnet hvor stor andel kolonier/strengkolonier som faller bort, heretter kalt kolonibortfallet, med hensyn til total andel enheter før mediumskift:

	T-47D-P	T-47D-P + 0.3 Gy
<b>Siste bilde før mediumskift (ca. 15 min)</b>		
Antall enkeltceller	4.7 ± 0.9	5.5 ± 0.8
Antall kolonier	22.4 ± 2.2	25.8 ± 3.9
Antall strengkolonier	2.4 ± 0.8	2.8 ± 1.3
Totalt	29.6 ± 3.1	34.2 ± 4.8
<b>Første bilde etter mediumskift (ca. 15 min)</b>		
Antall enkeltceller	2.3 ± 0.7	2.8 ± 0.5
Antall kolonier	21.7 ± 2.6	25.8 ± 3.8
Antall strengkolonier	2.0 ± 0.6	2.7 ± 1.1
Totalt	26.0 ± 2.9	31.3 ± 4.1
Andel bortfalte kolonier / strengkolonier beregnet fra totalt andel enheter før mediumskift	0.047 ± 0.020	0.012 ± 0.005

**Tabell 5.4: Andel bortfalte kolonier og strengkolonier fra totalt andel enheter før mediumskift**  
 Verdiene i tabell 5.4 viser antall enkeltceller, kolonier og strengkolonier 15 minutter før og etter mediumskift (tallene er hentet fra tabell 4.12, s.55). Andelen bortfalte kolonier/strengkolonier ble beregnet ved å dividere summen av antall bortfalte kolonier og strengkolonier med totalt antall enheter før mediumskift i alle filmforsøkene. Verdien presentert i tabellen er gjennomsnittsverdien av disse forsøkene.

Kolonibortfallet vises i tabell 5.4 lavere for primede celler som har mottatt effektbestråling (0.012) enn primede celler som ikke har dette (0.047). Dette kan muligens være en indikasjon på at festeevnen til de LDR-primede cellene øker som følge av en effektbestråling, men ettersom usikkerhetene tilknyttet verdiene er meget store, er det ikke sikkert at den observerte trenden er reell.

En metode for å undersøke om effektbestråling øker cellenes feste til underlaget vil beskrives i kapittel 5.8, s.76.

### Effektdosen stimulerer celler ut av $G_0$

En annen mulighet er at effektdosen stimulerer celler ut av  $G_0$ . Det har i denne oppgaven ikke blitt observert celler som har ligget udelte i flere dager for så å plutselig starte deling. Dette tyder på at dersom cellene stimuleres ut av  $G_0$ , skjer dette relativt hurtig etter bestrålingen har funnet sted.

En indikasjon på om denne hypotesen slår til er vanskelig å se ut fra filmdata. En kunne tenke seg at andelen udelte celler ved filmslutt ville gi et godt bilde på andelen celler i  $G_0$ , men ved filmslutt vil det og ligge en betydelig andel enkeltceller som har migrert ut fra kolonier. Hvorvidt disse cellene er celler i  $G_0$  eller prolifererende celler er ukjent.

I tillegg må det regnes med at mediumskiftet skyller vekk celler i  $G_0$ -fase, samtidig som det kan skylle ut uklonogene celler og migrasjonsceller. Hvor mange av de observerte enkeltcellene som representerer celler i  $G_0$ -fase vil derfor være vanskelig å fastslå ut fra filmdata i denne oppgaven.

En metode for å undersøke om effektbestrålingen stimulerer cellene ut av G<sub>0</sub> vil beskrives i kapittel 5.8, s.76.

### **5.4.2 Indusert bortfall av HRS**

De reelle "PE" i tabell 5.2 vises betydelig lavere for uprimede celler etter effektbestråling (0.703; 0.690) enn for primede celler etter effektbestråling (0.844; 0.836). Økningen i overlevelsesfraksjon dersom primingen gis før effektdosen beregnes til henholdsvis 20 og 21% ved å ta forholdet mellom reell "PE" for primede og uprimede celler, begge etter effektbestråling.

Mekanismene bak det induserte bortfallet av HRS er ikke kartlagt, men hypotese fremlagt av Edin et al. (2007) foreslår at LDR-primingen gjør det ATM-avhengige G<sub>2</sub>/M-kontrollpunktet permanent tilgjengelig for cellene, selv ved små stråledoser.

Våre data benekter ikke en slik teori. Data i tabell 5.2 (s.65) viser noenlunde samme reduksjon i reell "PE" når ubestrålte celler gis primingdose (8.0%; 6.2%) som økningen i reell "PE" når primede celler gis effektdose (10.6%; 10.3%), når "PE" måles 109 uker etter cellene ble eksponert for LDR-primingen. Dette, i kombinasjon med noenlunde lik reell "PE" for ubestrålte celler (0.829; 0.808) og celler eksponert for både LDR-priming og effektbestråling (0.844; 0.836), kan tyde på at effektdosen gitt de LDR-primede cellene opphever den overlevelsesreduserende effekten til LDR-primingdosen, eller at den resulterer i endringer som gjør dette.

Ettersom det induserte bortfallet av HRS resulterer i hele 20-21% høyere overlevelsesfraksjon virker det lite trolig at effekten beskrevet av Edin alene kan forklare økningen i overlevelsesfraksjon. Det ser altså ut til å være effekter som øker overlevelsesfraksjonen til de primede og effektbestrålte cellene ytterligere. Dette kan være effektene som står bak oversvinget over 1.0 i overlevelsesfraksjon, hvilket i denne oppgaven foreslås å være at effektdosen øker festeevnen til cellene eller stimulerer celler ut av G<sub>0</sub>, eller begge deler.

## **5.5 Koloniforsøk som metode**

Målt celleoverlevelse for koloniforsøk (figur 4.1-4.2, s.39 og 41) og filmforsøk (tabell 4.3-4.4, s.45-46) viser godt samsvar mellom henholdsvis overlevelsesreduksjon og overlevelsesøkning etter en 0.3 Gy effektdose, gitt henholdsvis uprimede (T-47D) og primede celler (T-47D-P).

Filmobservasjon har avslørt utsådde celler som danner flere kolonier ved å gjennomføre dublettdeling, kolonideling eller cellemigrasjon. Disse cellene vil overestimere den reelle "PE", dvs. at den målte "PE" er noe større enn den reelle.

Ved filmforsøk kan vi enkelt korrigere for slike bidrag ettersom vi ved å følge hver enkelt celle har full oversikt over antall startceller som danner flere kolonier. Ved koloniforsøk

vil en slik korrigering være vanskelig å gjennomføre, ettersom en ikke har mulighet for å bestemme størrelsen til korreksjonsfaktoren.

Verdier i tabell 5.1 (s.62) viser at andelen celler som gir opphav til flere kolonier varierer som følge av bestråling, der celler som mottar priming (0.075) eller effektdose (0.05) eller begge deler (0.066) ser ut til å ha en høyere andel celler som danner flere kolonier enn ubestrålte celler (0.019). Slike forskjeller vil feilberegne effekten av bestråling etter størrelsesforskjellen på de kolonikende bidragene, noe som kan påvirke den reelle overlevelsestrenden slik at denne gjengis feil.

I denne oppgaven viste korreksjonene seg å være relativt små. Både uttrykk av HRS og oversving underestimeres noe i koloniforsøk, men metodene gjengir de reelle effektene. Dersom korreksjonene derimot hadde overestimert "PE", kunne vi fått problemer ettersom korreksjonen kunne overestimert variasjonene i overlevelse og dermed påvirket forløpet til dose-respons kurven. Korreksjonene kan likevel være viktige dersom man måler i et område med små variasjoner i overlevelsesfraksjon. For å beregne overlevelsesfraksjonene i koloniforsøk mer korrekt, bør det innføres korreksjonsfaktorer som korrigerer målt "PE".

## **5.6 Svakheter og usikkerheter med utviklet filmmetode**

### **5.6.1 Økt celletetthet og redusert forsøks tid**

Ved filmforsøkene ble celletettheten økt og forsøks tiden derfor redusert i ønsket om å oppnå best mulig statistikk innenfor masteroppgavens tidsbegrensning. Det kan ikke utelukkes at dette kan påvirke celleoverlevelsen.

Det hadde også sine fordeler å øke celletettheten. Ved å gjøre dette fikk vi muligheten til å observere interaksjoner mellom celler og kolonier, hvilket ville vært problematisk dersom det kun hadde vært 200 celler i flasken.

Ved å redusere forsøks tiden (i ønsket om å oppnå best mulig statistikk innenfor masteroppgavens tidsbegrensning) får vi ikke dokumentert cellenes adferd i uke to. Vi observerer ved filmslutt en del celler som blir liggende i bildesnittet. Om disse cellene kan danne kolonier etter filmslutt kan ikke utelukkes, spesielt ettersom cellene kan være utsendte migrasjonsceller som kan ha ligget reelt kort tid i bildesnittet. Verdier fra tabell 4.3 og 4.4 (s. 45-46) viser langt høyere andel enkeltceller i sluttbildet for ubestrålte celler (0.022; 0.024) eller celler bestrålt med både priming og effektdose (0.050; 0.044), enn for celler som kun eksponeres for en bestråling, uavhengig om bestrålingen gis som priming (0.008) eller effektdose (0.008; 0.011). Dette betyr at dersom enkeltcellene kan danne kolonier innen  $t = 14$  dager vil overlevelsesøkningen være størst for disse cellepopulasjonene, noe som vil gi økt uttrykk av henholdsvis HRS og adaptivt fravær av HRS.



### **5.6.2 Kolonidefinisjon og kolonisammenvekst**

Ved filmforsøk valgte vi å definere en koloni som en celleansamling bestående av minst 6 celler der det hadde skjedd celledeling siste syklustid, dvs. siste 30 timer, mens en koloni ved koloniforsøk ble definert lik en ansamling med minst 50 celler. De fleste koloniene ved filmslutt besto av langt flere enn 6 celler og forskjellen i kolonidefinisjon virker ikke å ha påvirket overlevelsesfraksjonene i vesentlig grad.

Dersom kolonisammenvekst fant sted etter at celleansamlingene hadde nådd kolonidefinisjon ble kolonien ved filmslutt fortsatt talt som 2 kolonier, uavhengig om de gav uttrykk av å være en eller to kolonier ved filmslutt. En slik tilnærming ble valgt ettersom cellene ved et koloniforsøk er lengre fra hverandre enn for filmforsøk, og det betyr at koloniene mest sannsynlig ville dannet selvstendige kolonier dersom celletettheten hadde vært lav. En slik antagelse kan gi noe feil. Celler ved koloniforsøk kan også havne nære hverandre og dermed gro sammen tidlig i forsøket. Det er derimot lite sannsynlig at et betydelig antall celler vil gjøre dette ettersom cellene ble separert etter best mulig evne ved utsåing. At noe cellesammenvekst vil finne sted kan ikke utelukkes, men at dette vil påvirke celleoverlevelsen i betydelig grad virker lite sannsynlig.

### **5.6.3 Ulik tidsperiode frem til mediumskift, samt kryssbordbevegelse**

En annen uoverensstemmelse mellom koloni- og filmforsøk er ulik tidsperiode frem til mediumskift, samt kryssbordbevegelse ved filmforsøkene. Hvorvidt disse faktorene bidrar til økt cellebortfall ved mediumskift for filmforsøk er ukjent, men kan ikke utelukkes.

Studier av Edin (upublisert, personlig meddelelse) viste ingen forskjell i celleoverlevelse ved koloniforsøk dersom mediumskiftet ble utført etter henholdvis en eller to uker. Vi har heller ingen indikasjon i denne oppgaven på at ulikt tidsintervall frem til mediumskift påvirket cellebortfallet i filmforsøkene, men muligheten kan ikke utelukkes.

Om kryssbordbevegelse bidrar til cellebortfall ved mediumskift er uvisst, men kan ikke utelukkes. For sikrest mulig å unngå en slik effekt ble cellenes feste sjekket i mikroskop før filmstart, i tillegg til at celleflaskene ble behandlet med forsiktighet. Videre ble kun de startenhetene som observert som festede inkludert i forsøksdata.

### **5.6.4 Opptaksutsnitt**

I filmforsøk følger vi celleutviklingen i tre ulike posisjoner per celleflaske. Om disse posisjonene gjengir den reelle overlevelsestrenden i flasken er ikke sikkert. Samtidig vil celletettheten mellom posisjonene variere noe, noe som muligens kan påvirke celleoverlevelsen.

### 5.6.5 Subjektivitet

I observasjonsskjemaene, oppført i vedlegg D, tallfestes observasjonene fra filmene ved hjelp av en rekke ulike parametre. Observasjonene vurderes subjektivt, så personlige preferanser kan innvirke på tallfestingen. Dette er ikke en optimal situasjon, ettersom kategoriseringen av hva som observeres kan variere noe fra person til person.

I fremtidige studier bør metodene videreutvikles for å eliminere de subjektive vurderingene, slik at oppfattelsen av de ulike situasjonene blir mer personuavhengige. Hvordan dette kan gjøres vil jeg komme tilbake til i kapittel 5.8, s.76.

## 5.7 Feilkilder

### 5.7.1 Metode

Eventuelle svakheter og usikkerheter tilknyttet metodene for koloni og filmforsøk ble drøftet i henholdsvis kapittel 5.5 (s.72) og 5.6 (s.73).

### 5.7.2 Multiplisitet

I koloniforsøk ble det sådd ut en ekstra kontrollflaske som multiplisiteten ble beregnet ut fra. Flasken inneholdt omtrent 5000 celler, mens flaskene som korrigeres kun inneholdt 200 celler. Høyere celleantall i multiplisitetsflasken kan gi høyere multiplisitet enn det som er reelt, ettersom det vil være en økt sannsynlighet for at to eller flere celler festes nær hverandre og gir opphav til samme koloni. Korreksjonen kan dermed bli for høy, slik at overlevelsen underestimeres. Undersøkelser gjort på T-47D-celler har derimot vist at celleflasker inneholdende 200 og 5000 celler har tilnærmet lik multiplisitet ( $1.49 \pm 0.02$ ) etter 20 timer (Edin et al. 2008). Dette tyder på at antall utsådde celler ikke påvirker multiplisiteten, og dermed heller ikke overlevelsesfraksjonen, i betydelig grad.

I filmforsøk ble ikke multiplisiteten beregnet fra kontrollflasken, men fra cellepopulasjonen som skulle korrigeres. Korrigeringen ble utført på de samlede gjennomsnittlige sluttdata og ikke for hvert enkeltforsøk. Dette vil kunne medføre noe feil i den endelige overlevelsen for de bestrålte uprimede cellene, men feilen vil trolig ikke være tilstrekkelig til å endre den generelle overlevelsestrenden. At multiplisiteten beregnes fra den bestrålte flasken og ikke fra kontrollflasken vil være en potensiell feilkilde.

Overlevelsesfraksjoner over 1 skaper problemer ved multiplisitetskorreksjon, ettersom anvendt korreksjonsmodell ikke er laget for å behandle slike data. Ved overlevelsesfraksjoner over 1 har det av denne grunn ikke blitt korrigert for multiplisitet. Om det i det hele tatt bør korrigeres for multiplisitet er usikkert, ettersom det er nok å aktivere en celle i en enhet, uavhengig av celleantallet i enheten, for å danne en koloni. Det kan uansett ikke utelukkes at mangel på multiplisitetskorreksjon vil feilestimere celleoverlevelsen.

### 5.7.3 Temperatur

Studier har vist at temperaturen kan spille en vesentlig rolle på celleresponsen for T-47D-celler, ved at disse kun responderer med HRS dersom de blir bestrålt ved 37°C og ikke dersom bestrålingen utføres ved romtemperatur (Christiansen 2005).

For å hindre temperaturinnvirkning på resultatene har temperaturen blitt forsøkt holdt på et så stabilt nivå som mulig under forsøkene. De gangene celleflaskene ble fraktet i romtemperatur ble de pakket inn i laken eller plassert i forhåndsvarmede stålkamre for å minimere temperaturfallet. Under bestråling for koloniforsøk ble det anvendt en varmeplate, dette for å sikre stabil temperatur. Ved filmforsøk ble ikke varmeplaten benyttet ettersom bestrålingstiden kun var 36 sekunder, og temperaturfallet dermed minimalt.

Bildeopptaket ble utført i et varmerom, viss temperatur holdt 37°C. Noe temperaturendring vil forekomme når rommet entres og forlates, men dette vil være minimale endringer som lite sannsynlig vil innvirke på celletemperaturen.

Alt i alt virker det lite sannsynlig at temperaturforandringer har hatt noen innvirkning på resultatene i denne oppgaven. Det observeres heller ikke indikasjoner på dette.

## 5.8 Videre arbeid

### 5.8.1 Filmforsøk

Filmforsøk har i denne oppgaven vist seg som en god metode til å detektere den reelle celleoverlevelsen. Metoden har ledet til mange nye oppdagelser om cellens adferd, og hvordan adferden påvirkes av stråling. Fordelen med filmforsøk er at man gis muligheten til å følge hver enkelt celles utvikling gjennom hele forsøket, noe som gir et unikt innblikk i cellenes tilværelse. Dette gjør filmforsøk til en meget anvendelig metode til å undersøke hvordan ulike typer celler reagerer på ulike former for påvirkning som blant annet stråling, kjemiske stoffer, endringer i cellens vekstmiljø osv.

Metoden kan også gi et unikt innblikk i cellenes migrasjonsmønster, i tillegg til samspillet mellom celler. I filmene ble det observert celler som viste betydelige migrasjonsegenskaper, og enkelte av cellene så ut til å søke mot andre kolonier. Koloniene som cellen søkte mot ble ofte observert å inkludere migrasjonscellen i kolonien, men i enkelte tilfeller så den derimot ut til å motsette seg all kontakt med cellen, ved at den nektet cellen binding, eller at migrasjonscellen ble tatt inn for hurtig å sparkes ut igjen. Et slikt samspill mellom cellene ville vært interessant å undersøke ved filmobservasjon, men dersom et slikt studie skal bli optimalt må filmmetodene forbedres.

Det største negative momentet med filmforsøkene i denne oppgaven er at det trengs store mengder filmforsøk for å få et godt statistisk grunnlag. Vi valgte derfor i forsøkene å øke celletettheten og derfor redusere forsøkestiden for å oppnå best mulig statistikk. Det kan ikke utelukkes at slike inngrep vil påvirke celledoverlevelsen. I fremtidige studier bør det

utvikles teknikker som minimerer slike inngrep. Et eksempel på dette vil være avbildningsutstyr som scanner celleflaskene jevnlig under forsøkene, da helst uten å bevege celleflaskene, men ved å benytte et bevegelig kamera. Ved hjelp av en slik teknikk kunne en hurtig fått god statistikk, samtidig som observasjonene ville være representative for den gitte celleflasken. Slikt utstyr vil gi muligheten til å følge med på den cellulære utviklingen gjennom forsøket, samt å undersøke hvordan celletettheten påvirker celleoverlevelsen. I kroppen sitter cellene meget tett, så hvordan celletettheten innvirker på overlevelsen vil være viktig kunnskap, spesielt med tanke på bekjempelsen av kreft. Ved kreftbehandling vil andelen kreftceller reduseres som følge av behandlingen, noe som betyr at kreftcelletettheten avtar med tiden. Om normalcellene responderer på samme måte vil også være viktig informasjon, som muligens kunne utnyttes til å bedre behandlingsregimet.

I registrering av de ulike fenomenene er det viktig å begrense de subjektive vurderingene, dette for å sikre at personlige preferanser ikke påvirker resultatene. En måte å gjøre dette på vil være å la datamaskinen tolke bildene og bildenes utvikling ved hjelp av et bildeanalyseprogram. Vi kunne brukt programmering til å definere ulike forløp for så at bildeprogrammet kunne gjenkjent disse og tallfestet observasjonene. En slik måte å gripe an problemene ville gitt større sikkerhet rundt observasjonene, samtidig som det ville lette arbeidet for studenten ettersom den manuelle sorteringen frafaller.

### **5.8.2 ”Plating efficiency” og oversving over 1.0 i overlevelsesfraksjon**

En fordel med å bruke film til å beregne ”PE” er at en kan holde kontroll på ulike faktorer som kan påvirke denne. I denne oppgaven ble blant annet dublettdeling, kolonideling og cellemigrasjon oppdaget, hvilket avslørte en- og tocellede startenheter som gav opphav til flere kolonier. Ved å ha kontroll på andelen startenheter som gir opphav til flere kolonier, kan vi riktigere beregne den reelle ”PE”.

Det viste seg imidlertid at utslagene som ble målt på ”PE” som følge av disse faktorene ikke var artefakter som kunne forklare HRS og oversving over 1, men at de derimot maskerte deler av uttrykkene

I kapittel 5.4.1 (s.69) ble det foreslått at oversvinget kan skyldes en av følgende muligheter:

- Effektdosen øker festeevnen til T-47D-P-cellene
- Effektdosen stimulerer T-47D-P-celler ut av hvilefase,  $G_0$

Den første muligheten kan undersøkes ved å anvende ”Manipulation Force Microscopy”-metode beskrevet av Sagvolden (1998). Sagvolden studerte cellenes festekraft til underlaget ved å føre en spatel tett inntil enkeltceller og yte press direkte på disse. Ved å beregne kraften spatelen må utøve på cellen for at cellens bindinger til underlaget skal brytes, kan man beregne festekraften til cellen. For å undersøke om effektbestrålingen øker cellefestet kan Sagvoldens metode benyttes til å undersøke om det er noen forskjell i festekraften mellom primede celler som har mottatt effektbestråling, og primede celler som ikke har dette.

Den andre muligheten kan for eksempel undersøkes ved bruk av en metafasehemmer i kombinasjon med DNA flow cytometri. Et DNA-histogram viser hvordan cellene fordeler seg i de ulike fasene i cellyklus, der både  $G_1$ - og  $G_0$ -cellene har samme DNA-innhold. Ettersom vi i et DNA-histogram ikke kan skille  $G_0$ - fra  $G_1$ -celler, må vi ta i bruk en metafasehemmer. En metafasehemmer hindrer cellene i å fullføre mitosen, noe som betyr at alle de prolifererende cellene etter en gitt tid vil samle seg i mitosen og eventuelt gå til grunne der. Ved å lage et DNA-histogram ved dette tidspunktet vil de cellene som representerer andelen celler i  $G_1$ , i realiteten være  $G_0$ -celler. For å undersøke om en effektdose kan stimulere celler ut av  $G_0$ , kan vi nå eksponere cellene for bestrålingen, og se om andelen celler i  $G_0$ -fase reduseres ved å lage et nytt DNA-histogram.

## 6 Konklusjon

”Time-lapse” film-forsøkene i denne oppgaven har avslørt en rekke cellulære hendelser som påvirker det endelige koloniantallet, deriblant dublettdeling, kolonideling og cellemigrasjon. Undersøkelsene i denne oppgaven har vist at uttrykk av HRS, oversving over 1.0 i overlevelsesfraksjon og induisert bortfall av HRS ikke kan forklares ut fra effekter som de cellulære effektene som påvirker det endelige koloniantallet. Tvert imot ser det ut til at disse effektene maskerer deler av uttrykkene, noe som betyr at disse reelt sett er større enn hva den målte celleoverlevelsen tilsier.

Selv om ”time-lapse” film ikke har bidratt til å forklare fenomenene som ble ønsket undersøkt, har den åpnet for to mulige mekanismer bak oversvinget over 1.0 i overlevelsesfraksjon:

- Oversvinget over 1.0 i overlevelsesfraksjon i LDR-primede celler kan skyldes at effektdosen øker cellenes feste til underlaget.
- En annen mulig teori er at oversvinget over 1.0 i overlevelsesfraksjon skyldes at effektdosen stimulerer celler ut av  $G_0$  og inn i cellesyklus.

For å trekke endelige slutninger angående disse mulighetene er det nødvendig med ytterligere undersøkelser.

## Referanser

**Abraham VC**, Krishnamurthi V, Taylor DL og Lanni F, 1999. *The actin-based nanomachine at the leading edge of migrating cells*. Biophysical Journal, Vol.77: 1721-1732.

**Alberts B**, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K og Walter P, 2002. *Molecular biology of the cell*, 4<sup>th</sup> edition. Garland Science, New York.

**Attix FH**, 2004. *Introduction to radiological physics and radiation dosimetry*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

**Bartolletto E**, Mognato M, Ferraro P, Canova S, Cherubini R, Celotti L og Russo A, 2001. *Chromosome instability induced in cell progeny of human T lymphocytes irradiated in G(0) with gamma-rays*. Mutagenesis, Vol. 16: 529-537.

**Casey G**, Lo-Hsueh M, Lopez ME og Vogelstein EJ, 1991. *Growth suppression of human breast cancer cells by the introduction of a wild-type p53 gene*. Oncogene, Vol. 6: 1791-1797.

**Chadwick KH** og Leenhouts HP, 1973. *A molecular theory of cell survival*. Physics in Medicine and Biology, Vol. 18: 78-87.

**Chang WP** og Little JB, 1991. *Delayed reproductive death in x-irradiated Chinese hamster ovary cells*. International Journal of Radiation Biology, Vol.60: 483-496.

**Christiansen K**, 2005. *Adaptive effector av små røntgenstråledoser for celler dyrket i kultur*. Candidata Scientiarum oppgave, Universitetet i Oslo.

**Cregan SP**, Brown DL og Mitchell EJ, 1999. *Apoptosis and the adaptive response in human lymphocytes*. International Journal of Radiation Biology, Vol. 75: 1087-1094.

**Edin NJ**, 2003. *Hyper-radiosensitivity and induced radioresistance (HRS/IRR). The effects of using different dose-rates for pre-exposure on the hyper-radiosensitivity in T-47D cells*. Candidata Scientiarum oppgave, Universitetet i Oslo.

**Edin NJ**, Olsen DR, Stokke T og Pettersen EO, 2007. *Recovery of low-dose hyper-radiosensitivity following a small priming dose depends on priming dose-rate*. International Journal of Low Radiation, Vol. 4: 69-86.

**Edin NJ**, Sandvik JA, Olsen DR og Pettersen EO, 2008. *The elimination of low-dose hyper-radiosensitivity by transfer of irradiated cell conditioned medium depends on dose-rate*. Radiation Research, submitted.

**Enns L**, Bogen KT, Wizniak J, Murtha AD og Weinfeld M, 2004. *Low-dose radiation hypersensitivity is associated with p53-dependent apoptosis*. Molecular Cancer Research, Vol. 10: 557-566.

**Even-Ram S**, Doyle AD, Conti MA, Matsumoto K, Adelstein RS og Yamada KM, 2007. *Myosin IIA regulates cell motility and actomyosin-microtubule crosstalk*. Nature Cell Biology, Vol. 9: 299-309.

**Feinendegen LE**, Bond VP, Sondhaus CA og Altman KI, 1999. *Cellular signal adaption with damage control at low doses versus the predominance of DNA damage at high doses*. Life Sciences, Vol. 322: 245-251.

**Fitzek M** og Trott KR, 1993. *Clonal heterogeneity in delayed decrease of "plating efficiency" of irradiated HeLa cells*. Radiation and Environmental Biophysics, Vol. 32: 33-39.

**Giannone G**, Dubin-Thaler BJ, Döbereiner HG, Kieffer N, Bresnick AR og Sheetz MP, 2004. *Periodic lamellipodial contractions correlate with rearward actin waves*. Cell, Vol. 116: 431-443.

**Gollin SM**, 2004. *Chromosomal instability*. Current Opinion in Oncology, Vol. 16: 25-31.

**Gorgojo L** og Little JB, 1989. *Expression of lethal mutations in progeny of irradiated mammalian cells*. International Journal of Radiation Biology, Vol. 55: 619-630.

**Hall EJ** og Giaccia AJ, 2006. *Radiobiology for the radiologist, 6<sup>th</sup> edition*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

**Holmberg K**, Meijer AE, Harms-Ringdahl M og Lambert B, 1998. *Chromosomal instability in human lymphocytes after low dose rate gamma-radiation and delayed mitogen stimulation*. International Journal of Radiation Biology, Vol. 73: 21-34.

**Joiner MC** og Johns H, 1988. *Renal damage in the mouse: the response to very small doses per fraction*. Radiation Research, Vol. 114: 385-398.

**Joiner MC**, Lambin P, Malaise EP, Arrand JE, Skov KA og Marples B, 1996. *Hypersensitivity to very-low single radiation doses: Its relationship to the adaptive response and induced radioresistance*. Mutation Research, Vol. 358: 171-183.

**Joiner MC**, Marples B, Lambin P, Short SC og Turesson I, 2001. *Low-dose hypersensitivity: current status and possible mechanisms*. International Journal of Radiation Oncology, Biology and Physics, Vol.49: 379-389.

**Karp G**, 2002. *Cell and Molecular Biology, 3th edition*. John Wiley & Sons, New York.



**Keydar I**, Chen L, Karby S, Weiss FR, Delarea J, Radu M, Chaitcik S og Brenner HJ, 1979. *Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin*. European Journal of Cancer, Vol. 15: 659-670.

**Kiefer J**, 1990. *Biological radiation effects*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.

**Krueger SA**, Joiner MC, Weinfeld M, Piasentin E og Marples B, 2007. *Role of apoptosis in low-dose hyper-radiosensitivity*. Radiation Research, Vol. 167: 260-267.

**Lambin P**, Malaise EP og Joiner MC, 1996. *Might intrinsic radioresistance of human tumor cells be induced by radiation?* International Journal of Radiation Biology, Vol. 69: 279-290.

**Lorentzen H**, 2001. *Effect of the protein synthesis inhibitor P-1013 on repair after x-irradiation of human cells in culture*. Candidata Scientiarum oppgave. Universitetet i Oslo.

**Lengauer C**, Kinzler KW og Vogelstein B, 1998. *Genetic instabilities in human cancers*. Nature, Vol. 396: 643-649.

**Little JB**, Nagasawa H, Pfenning T og Vetrovs H, 1997. *Radiation-induced genomic instability: delayed mutagenic and cytogenic effects of x-rays and alpha particles*. Radiation Research, Vol. 148: 299-307.

**Løvhaug D**, Wibe E, Oftebro R, Pettersen EO og Brustad T, 1977. *Recovery from x-ray induced damage in human cells grown in culture*. Neoplasma, Vol 24: 513-520.

**Marples B** og Joiner MC, 1993. *The response of Chinese Hamster V79 cells to low radiation doses: evidence of enhanced sensitivity of the whole cell population*. Radiation Research, Vol 133: 41-51.

**Marples B** og Joiner MC, 1995. *The elimination of low dose hypersensitivity in chinese hamster V79-379A cells by pretreatment with x-rays or hydrogen peroxide*. Radiation Research, Vol. 141: 160-169.

**Marples B** og Joiner MC, 2000. *Modification of survival by DNA repair modifiers: A probable explanation for phenomenon of increased radioresistance*. International Journal of Radiation Biology, Vol. 76: 305-312.

**Marples B**, Wouters BG og Joiner MC, 2003. *An association between the radiation-induced arrest of G<sub>2</sub>-phase cells and low-dose hyper-radiosensitivity: A plausible underlying mechanism?* Radiation Research, Vol.160: 38-45.

**Marples B**, Wouters BG, Collis SJ, Chalmers AJ og Joiner MC, 2004. *Low-dose hyper-radiosensitivity: A consequence of ineffective cell cycle arrest of radiation-damaged G<sub>2</sub>-phase cells*. Radiation Research, Vol. 161: 247-255.

**Mogilner A** og Oster G, 2003. *Polymer motors: Pushing out the front and pulling up the back*. Current Biology, Vol. 13: 721-733.

**Mothersill C**, Kadhim M, O'Reilly S, Papworth D, Marsden S, Seymour C og Wright W, 2000. *Dose- and time-response relationships for lethal mutations and chromosomal instability induced by ionizing radiation in an immortalized human keratinocyte cell line*. International Journal of Radiation Biology, Vol. 76: 799-806.

**Olivieri G**, Bodycote J og Wolff S, 1984. *Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine*. Science, Vol. 233: 594-597.

**Opstad HK**, 2005. *Matematisk modellering av cellers hypersensitivitet for små doser ved bestråling med pulset doserate*. Masteroppgave, Universitetet i Oslo.

**Ponnaiya B**, Jenkins-Baker G, Bigelow A, Marino S og Geard C, 2004. Detection of chromosomal instability in  $\alpha$ -irradiated and bystander human fibroblasts. Mutation Research, Vol. 568: 41-48.

**Raaphorst GP** og Boyden S, 1999. *Adaptive response and its variation in human normal and tumor cells*. International Journal of Radiation Biology, Vol. 75: 865-873.

**Sagvolden G**, 1998. *Manipulation Force Microscopy*. Doctor Philosophiae oppgave, Universitetet i Oslo.

**Seymour CB**, Mothersill C og Alper T, 1986. *High yields of lethal mutations in somatic mammalian cells that survive ionizing radiation*. International Journal of Radiation Biology, Vol. 50: 167-169.

**Shadley JD**, Afzal V og Wolff S, 1987. *Characterization of the adaptive response to ionizing radiation induced by low doses of x-rays to human lymphocytes*. Radiation Research, Vol. 111: 511-517.

**Shadley JD** og Wiencke JK, 1989. *Introduction of the adaptive response by X-rays is dependent on radiation intensity*. International Journal of Radiation Biology, Vol. 56: 107-118.

**Sinclair WK**, 1966. *The shape of radiation survival curves of mammalian cells cultured in vitro*. Biophysical Aspects of Radiation Quality (Technical Report Series No. 58: 21-43), International Atomic Energy Agency, Wien.

**Skwarchuk MW**, Wouters BG og Skarsgard LD, 1993. *Substructure in the radiation survival response at low dose rate: a synchronous and partially synchronized V79-WNRE cells*. International Journal of Radiation Biology, Vol. 64: 601-612.

**Short SC**, Kelly J, Mayes CR, Woodcock M og Joiner MC, 2001. *Low-dose hypersensitivity after fractionated low-dose irradiation in vitro*. International Journal of Radiation Biology, Vol. 77: 655-664.

**Short SC**, Woodcock M, Marples B og Joiner MC, 2003. *The effects of cell cycle phase on low dose hyper-radiosensitivity*. International Journal of Radiation Biology, Vol. 79: 99-105.

**Smith LG**, Miller RC, Richards M, Brenner DJ og Hall EJ, 1999. *Investigation of hypersensitivity to fractionated and partially synchronized V69-WNRE cells*. International Journal of Radiation Oncology, Vol. 45: 187-191.

**Steel GG**, 1997. *Basic Clinical Radiobiology*. Arnold, London.

**Stokke T**, Erikstein BK, Smedshammer L, Boye E og Steen HB, 1993. *The retinoblastoma gene product is bound in the nucleus in early G<sub>1</sub> phase*. Experimental Cell Research, Vol. 204: 147-155.

**Suzuki K**, Takahara R, Kodama S og Watanabe M, 1998. *In situ detection of chromosome bridge formation and delayed reproductive death in normal human embryonic cells surviving x irradiation*. Radiation Research, Vol. 150: 375-381.

**Wolgemuth CW**, 2005. *Lamellipodial contractions during crawling and spreading*. Biophysical Journal, Vol. 89: 1643-1649.

**Wolgemuth CW**, Miao L, Vanderlinde O, Roberts T og Oster G, 2005. *MSP dynamics drives nematode sperm locomotion*. Biophysical Journal, Vol. 88: 2462-2471.

**Wouters BG** og Skarsgard LD, 1997. *Low-dose radiation sensitivity and induced radioresistance to cell killing in HT-29 cells is distinct from the "adaptive response" and cannot be explained by a subpopulation of sensitive cells*. Radiation Research, Vol. 148: 435-442.

**Xu B**, Kim ST, Lim DS og Kastan MB, 2002. *Two molecularly distinct G<sub>2</sub>/M checkpoints are induced by ionizing irradiation*. Molecular and Cellular Biology, Vol. 22: 1049-1059.

**Åmellem Ø**, Sandvik JA, Stokke T og Pettersen EO, 1998. *The retinoblastoma protein-associated cell cycle arrest in S-phase under moderate hypoxia is disrupted in cells expressing HPV18 E7 oncoprotein*. British Journal of Cancer, Vol. 77: 862-872.

## Vedlegg A: Kjemikalieliste

Nedenfor følger en alfabetisk liste over alle kjemikalier benyttet ved laboratoriearbeidet, samt tilhørende produsent eller leverandør.

Kjemikalie	Produsent
EDTA (etylenediaminetetraacetic acid)	Fluka (Sveits)
Etanol, 96%	Arcus AS (Oslo)
Fenolrødt	Merck (Tyskland)
Føtalt kalveserum	Euroclone (England)
Glukose	Sigma (USA)
Hoechst fargestoff, 33258 (624 µg/ml)	Riedel de Haën (Tyskland)
Insulin	Sigma (USA)
KCl	Merck (Tyskland)
L-glutamin	Sigma (USA)
Metylenblått	Merck (Tyskland)
Milli-Q-vann	Millipore (USA)
NaCl	Riedel de Haën (Tyskland)
NaCHO <sub>3</sub>	Norsk medisinaldepot (Oslo)
PBS	Euroclone (England)
Penicillin-Streptomycin (5000 IU/ml – 5000 µg/ml)	Euroclone (England)
RPMI-pulver med L-glutamin	JHR Biosciences (USA)
RPMI stamløsning	Euroclone (England)
Trypsinpulver	Roche (Tyskland)

## Vedlegg B: Oppskrifter

### RPMI 1640 medium

---

#### Stamløsning, 1 liter

RPMI 1640 pulver	10.43 g
NaHCO <sub>3</sub>	2.00 g
Milli-Q-vann	1.00 l

#### RPMI medium med serum, 1 liter

RPMI 1649 stamløsning	880 ml
Føtalt kalveserum	100 ml
Penicillin-Streptomycin	10 ml
Insulin (200 enheter/l)	2 ml
L-glutamin	10 ml

### Trypsin

---

#### Trypsin stamløsning, 1 liter

NaCl	8.00 g
KCl	0.40 g
Glukose	1.00 g
NaHCO <sub>3</sub>	0.35 g
Fenolrødt	0.002 g

#### Trypsin med EDTA, 1 liter

Trypsin stamløsning	1.0 l
EDTA	200 mg
Trypsinpulver	500 mg

### L-glutamin, 35 ml

---

L-glutamin	1.0227 g
RPMI stamløsning	35 ml

### PBS, 1 liter

---

NaCl	8.000 g
KCl	0.201 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.204 g
NaHPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	2.858 g
Milli-Q-vann	1 l

## Vedlegg C: Koloniforsøk

### I Oversikt over koloniforsøkene

Forsøk	Primingdose <sup>(1)</sup>	Effektdose <sup>(2)</sup>	Kommentar
T1-T4	-	0.1-2 Gy	Cellene ble nylig tatt opp av fryseren. Forsøk T1-T3 ble utført 3 uker etter opptining, mens T4 ble utført 7 uker etter opptining
T5 <sup>(3)</sup>	-	0.1-2 Gy	Cellene har vært i bruk lenge
P1-P7 <sup>(4)</sup>	0.3 Gy	0.1-2 Gy	Effektbestrålingene ble gitt 89-109 uker etter primingdosen

<sup>(1)</sup> Primingdosen ble levert ved [<sup>60</sup>Co]- $\gamma$ -stråling den 17.august 2005 av Nina Edin. Doseraten var 0.3 Gy/time.

<sup>(2)</sup> Effektdosen ble levert ved akutt røntgenstråling. Doseraten var 30 Gy/time.

<sup>(3)</sup> En celleflaske (0.1 Gy) ble kastet grunnet infeksjon.

<sup>(4)</sup> I forsøk P1 ble det sådd ut dobbelt antall celleflasker.

Det ble kastet enkeltflasker i P1, P4, P5 og P6 grunnet infeksjon. I P6 ble i tillegg 3 celleflasker (0.1 Gy) utelatt, ettersom disse veltet under fiksering slik at flere kolonier løsnet.

## II Eksperimentielle rådata

I dette vedlegget vil alle rådata fra forsøkene bli representert. Forsøksdataene vil sorteres sammen med forsøk med lik karakteristikk (se forsøksoversikt ovenfor), og det vil bli plottet summasjons og middelerverdiplott av de ulike forsøksgruppene.

### T-47D, akutt bestråling, ingen primingdose

Forsøk T1-T3 ble utført på nyopptinte celler, 3 uker etter opptining.

#### Forsøk: T1

Dato: 24. oktober 2007

Dose: 2.0 Gy									
Multiplisitet: M = 1.3234			Plating Efficiency. PE = 0.874						
Dose (Gy)	K	K	0.1	0.2	0.3	0.5	0.75	1	2
Flaske 1	171	160	163	164	155	144	127	146	100
Flaske 2	187	161	164	160	149	154	112	135	120
Flaske 3	182	183	165	169	148	161	165	126	120
Flaske 4	163	168	180	168	155	140	172	145	120
Flaske 5	197	176	165	178	164	162	135	131	100
Antall utsådde celler per flaske	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Gjennomsnittlig antall kolonier per flaske: N		174.8	167.4	167.8	154.2	152.2	142.2	136.6	112
ΔN		3.904	3.172	3.007	2.853	4.432	11.408	3.906	4.899
Overlevelsesfraksjon: OF			0.958	0.960	0.882	0.871	0.814	0.781	0.641
ΔOF			0.028	0.027	0.026	0.032	0.068	0.028	0.031
Overlevelsesfraksjon korrigert for multiplisitet: f			0.939	0.942	0.838	0.824	0.753	0.716	0.561
Δf			0.039	0.039	0.033	0.041	0.081	0.034	0.034

#### Forsøk: T2

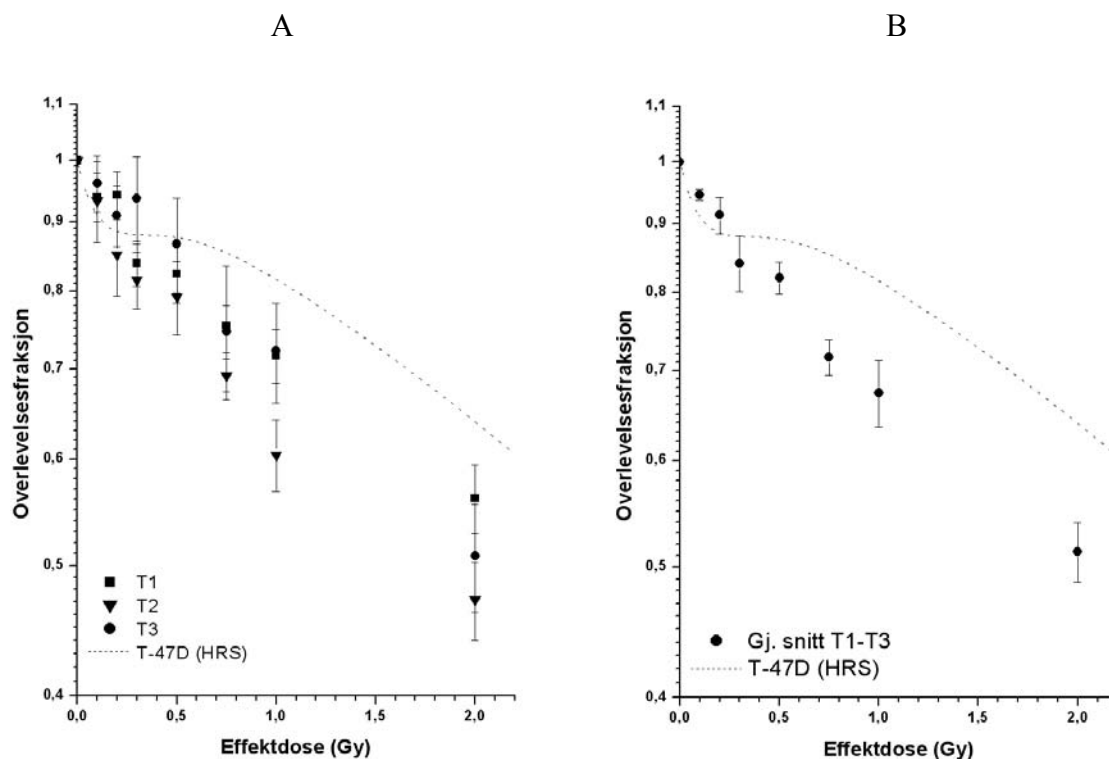
Dato: 28. oktober 2007

Date: 2019-08-26: 20:07									
Multiplisitet: M = 1.2877			Plating Efficiency. PE = 0.687						
Dose (Gy)	K	K	0.1	0.2	0.3	0.5	0.75	1	2
Flaske 1	129	127	146	106	122	117	104	86	66
Flaske 2	142	151	143	114	110	113	97	104	86
Flaske 3	153	144	125	120	127	108	104	80	65
Flaske 4	127	138	121	136	110	133	111	96	78
Flaske 5	139	123	118	133	120	105	101	96	78
Antall utsådde celler per flaske	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Gjennomsnittlig antall kolonier per flaske: N		137.3	130.6	121.8	117.8	115.2	103.4	92.4	74.6
ΔN		3.317	5.802	5.660	3.382	4.903	2.293	4.214	3.995
Overlevelsesfraksjon: OF			0.951	0.887	0.858	0.839	0.753	0.673	0.543
ΔOF			0.048	0.046	0.032	0.041	0.025	0.035	0.032
Overlevelsesfraksjon korrigert for multiplisitet: f			0.933	0.851	0.815	0.792	0.692	0.604	0.472
Δf			0.064	0.058	0.040	0.050	0.029	0.038	0.032

**Forsøk: T3**

Dato: 31. oktober 2007

Multiplisitet: M = 1.2282			Plating Efficiency. PE = 0.510						
Dose (Gy)	K	K	0.1	0.2	0.3	0.5	0.75	1	2
Flaske 1	112	106	99	91	104	74	78	64	69
Flaske 2	98	102	101	98	109	101	84	83	47
Flaske 3	117	100	102	88	94	89	83	86	62
Flaske 4	88	84	99	98	82	102	80	69	62
Flaske 5	96	116	93	98	95	89	77	89	48
Antall utsådde celler per flaske	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Gjennomsnittlig antall kolonier per flaske: N		101.9	98.8	94.6	96.8	91	80.4	78.2	57.6
$\Delta N$		3.516	1.562	2.135	4.641	5.089	1.364	4.934	4.320
Overlevelsesfraksjon: OF			0.970	0.928	0.950	0.893	0.789	0.767	0.565
$\Delta OF$			0.037	0.038	0.056	0.059	0.030	0.055	0.047
Overlevelsesfraksjon korrigert for multiplisitet: f			0.961	0.910	0.936	0.867	0.746	0.722	0.508
$\Delta f$			0.047	0.047	0.070	0.071	0.035	0.062	0.047



**Figur C.1: Overlevelsesfraksjoner (A) og gjennomsnittlige overlevelsesfraksjoner (B) som funksjon av effektdose (rtg) for T-47D-celler**

Datapunktene representerer overlevelsesfraksjoner (A) og overlevelsesfraksjonenes middelerverdi (B), samt tilhørende standardfeil, for forsøk T1-T3, eksponert for effektdoser. Effektdosen ble levert ved akutt røntgenstråling 30 Gy/time. Middelerverdiene i plott B ble beregnet ved å vekte overlevelsesfraksjonene i plott A etter standardfeilen i hvert forsøk. Både overlevelsesfraksjonene (A) og middelerverdiene (B) er plottet mot en tilpasning ved minste kvadrert metode til IR-modellen (kapittel 2.3.4, s.21) for effektbestrålte, dvs. uprimede T-47D-celler etter eksperimenter utført av Edin (upublisert, personlig meddelelse)



Forsøk T4 ble utført på celler som hadde vært i bruk i litt over 2 år, mens forsøk T5 ble utført på T-47D-celler som ble tatt opp av fryseren 7 uker før eksperimentet.

#### Forsøk: T4

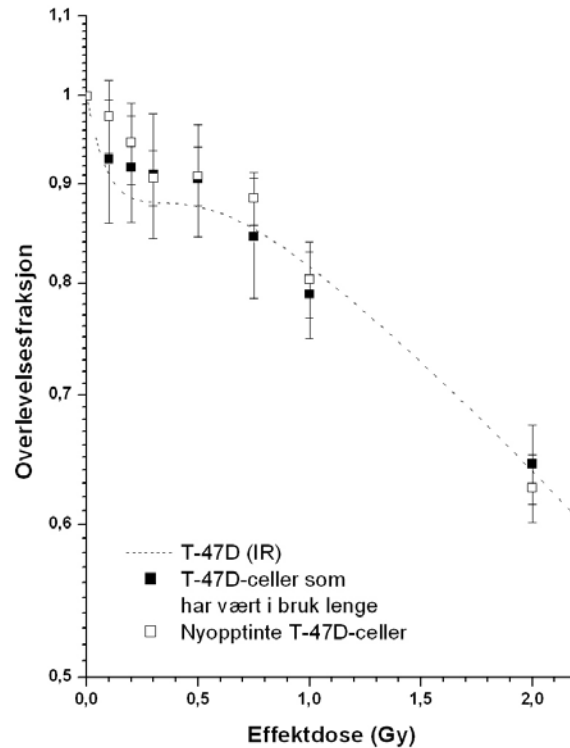
Dato: 27. november 2007

Multiplisitet, M = 1,4069			Plating Efficiency, PE = 0,840						
Dose (Gy)	K	K	0.1	0.2	0.3	0.5	0.75	1	2
Flaske 1	161	155	170	167	150	147	138	147	119
Flaske 2	176	194	170	145	159	152	138	142	120
Flaske 3	181	174	155	166	151	154	156	141	130
Flaske 4	136	170	142	160	153	172	159	138	124
Flaske 5	152	181	165	159	180	165	164	152	127
Antall utsådde celler per flaske	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Gjennomsnittlig antall kolonier per flaske: N		168	160,4	159,4	158,6	158	151	144	124
$\Delta N$		5,391	5,354	3,932	5,573	4,572	5,459	2,470	2,074
Overlevelsesfraksjon: OF			0,955	0,949	0,944	0,940	0,899	0,857	0,738
$\Delta OF$			0,044	0,038	0,045	0,041	0,043	0,031	0,027
Overlevelsesfraksjon korrigert for multiplisitet: f			0,927	0,918	0,911	0,906	0,846	0,790	0,645
$\Delta f$			0,068	0,058	0,068	0,061	0,061	0,041	0,031

#### Forsøk: T5

Dato: 29. november 2007

Multiplisitet, M = 1,3364			Plating Efficiency, PE = 1,666						
Dose (Gy)	K	K	0.1	0.2	0.3	0.5	0.75	1	2
Flaske 1	330	352	324	312	308	298	298	308	257
Flaske 2	320	370	345	327	311	309	310	281	223
Flaske 3	328	315	332	336	320	326	319	284	239
Flaske 4	327	304	310	290	298	306	304	295	233
Flaske 5	350	335		339	321	321	300	259	223
Antall utsådde celler per flaske	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Gjennomsnittlig antall kolonier per flaske: N		333,1	327,75	320,8	311,6	312	306,2	285,4	235
$\Delta N$		6,171	7,330	9,019	4,226	5,089	3,800	8,128	6,293
Overlevelsesfraksjon: OF			0,984	0,963	0,935	0,937	0,919	0,857	0,705
$\Delta OF$			0,029	0,032	0,021	0,023	0,020	0,029	0,023
Overlevelsesfraksjon korrigert for multiplisitet: f			0,976	0,946	0,907	0,909	0,885	0,804	0,627
$\Delta f$			0,042	0,046	0,030	0,032	0,028	0,037	0,026



**Figur C.2:** Overlevelsesfraksjon som funksjon av effektdose for nyopptinte T-47D-celler og T-47D-celler som har vært i bruk over 2 år.

Datapunktene representerer overlevelsesfraksjoner fra to forsøk med ulike cellebatcher bestrålt med effektdose, samt tilhørende standardfeil. Den ene cellebatchen (■ = T4) har vært i bruk lenge, mens den andre cellebatchen (□ = T5) ble tatt opp av fryseren 7 uker før eksperimentet. Effektdosene ble levert ved 30 Gy/time akutt røntgenstråling.

**T-47D-P, akutt røntgenbestråling, primet med 0.3 Gy LDR  
(0.3 Gy/time) [<sup>60</sup>Co]-γ-stråling den 17.08.2005.**

**Forsøk: P1**

Dato: 9. april 2007

Multiplisitet: M = 1.3333			Plating Efficiency. PE = 1.296							
Dose (Gy)	K	K	0.1	0.2	0.3	0.5	0.75	1	2	
Flaske 1	243	248	255	234	273	249	210	193	143	
Flaske 2	267	271	297	274	246	247	234	191	176	
Flaske 3	243	271	292	276	256	233	253	206	194	
Flaske 4	283	272	253	271	282	276	232	193	177	
Flaske 5	239	247	247	251	272	268	260	198	151	
Flaske 6	231	261	247	253	232	261	254	204	177	
Flaske 7	263	207	249	265	241	274	252	179	160	
Flaske 8	255	271	280	236	254	251	254	174	146	
Flaske 9	271	297	278	265	240	275	236	217	182	
Flaske 10	270	274	252	269	251	264	258	181		
Antall utsådde celler per flaske	200	200	200	200	200	200	200	200	200	
Gjennomsnittlig antall kolonier per flaske: N		259.2	265	259.4	254.7	259.8	244.3	193.6	167.3	
ΔN		4.552	5.174	4.264	2.816	3.138	2.706	5.869	5.487	
Overlevelsesfraksjon: OF			1.022	1.001	0.983	1.002	0.943	0.747	0.646	
ΔOF			0.027	0.024	0.020	0.021	0.020	0.026	0.024	
Overlevelsesfraksjon korrigert for multiplisitet: f			1.022	1.001	0.974	1.002	0.917	0.674	0.564	
Δf			0.027	0.024	0.030	0.021	0.027	0.031	0.026	

**Forsøk: P2**

Dato: 9. april 2007

Multiplisitet: M = 1.1951			Plating Efficiency. PE = 0.946							
Dose (Gy)	K	K	0.1	0.2	0.3	0.5	0.75	1	2	
Flaske 1	202	177	173	194	205	203	171	115	126	
Flaske 2	202	186	209	212	182	164	161	144	116	
Flaske 3	170	178	186	194	200	184	190	136	112	
Flaske 4	191	183	191	202	203	189	171	162	122	
Flaske 5	200	202	206	171	188	180	159	140	126	
Antall utsådde celler per flaske	200	200	200	200	200	200	200	200	200	
Gjennomsnittlig antall kolonier per flaske: N		189.1	193	194.6	195.6	184	170.4	139.4	120.4	
ΔN		3.805	6.626	6.765	4.501	6.332	5.492	7.547	2.786	
Overlevelsesfraksjon: OF			1.021	1.029	1.034	0.973	0.901	0.737	0.637	
ΔOF			0.041	0.041	0.032	0.039	0.034	0.043	0.020	
Overlevelsesfraksjon korrigert for multiplisitet: f			1.021	1.029	1.034	0.967	0.881	0.696	0.589	
Δf			0.041	0.041	0.032	0.047	0.040	0.047	0.022	

**Forsøk: P3**

Dato: 26. april 2007

Multiplisitet: M = 1.1310			Plating Efficiency. PE = 1.107						
Dose (Gy)	K	K	0.1	0.2	0.3	0.5	0.75	1	2
Flaske 1	221	225	212	218	240	271	214	241	252
Flaske 2	230	219	224	222	219	250	231	214	206
Flaske 3	226	232	225	229	280	243	255	190	178
Flaske 4	225	223	227	242	236	239	226	223	174
Flaske 5	200	213	237	235	258	268	202	220	176
Antall utsådde celler per flaske	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Gjennomsnittlig antall kolonier per flaske: N		221.4	225	229.2	246.6	254.2	225.6	217.6	197.2
$\Delta N$		2.926	3.987	4.329	10.400	6.507	8.903	8.238	14.894
Overlevelsesfraksjon: OF			1.016	1.035	1.114	1.148	1.019	0.983	0.891
$\Delta OF$			0.022	0.024	0.049	0.033	0.042	0.039	0.068
Overlevelsesfraksjon korrigert for multiplisitet: f			1.016	1.035	1.114	1.148	1.019	0.980	0.877
$\Delta f$			0.022	0.024	0.049	0.033	0.042	0.045	0.076

**Forsøk: P4**

Dato: 5. september 2007

Multiplisitet: M = 1.1867			Plating Efficiency. PE = 0.837						
Dose (Gy)	K	K	0.1	0.2	0.3	0.5	0.75	1	2
Flaske 1	183	157	161	172	181	141	150	142	116
Flaske 2	175	173	176	171	163	146	164	127	102
Flaske 3	151	155	144	172	161	147	151	155	100
Flaske 4	155	194	167	160	152	148	155	161	123
Flaske 5	163		150	153	153	148		159	127
Antall utsådde celler per flaske	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Gjennomsnittlig antall kolonier per flaske: N		167.3	159.6	165.6	162	146	155	148.8	113.6
$\Delta N$		4.922	5.750	3.881	5.215	1.304	3.189	6.375	5.446
Overlevelsesfraksjon: OF			0.954	0.990	0.968	0.873	0.926	0.889	0.679
$\Delta OF$			0.044	0.037	0.042	0.027	0.033	0.046	0.038
Overlevelsesfraksjon korrigert for multiplisitet: f			0.944	0.987	0.961	0.849	0.911	0.868	0.636
$\Delta f$			0.053	0.045	0.051	0.031	0.039	0.054	0.041

**Forsøk: P5**

Dato: 7. september 2007

Multiplisitet: M = 1.1496			Plating Efficiency. PE = 0.685						
Dose (Gy)	K	K	0.1	0.2	0.3	0.5	0.75	1	2
Flaske 1	145	120	132	159	132	125	130	120	86
Flaske 2	154	146	145	140	153	121	109	108	103
Flaske 3	140	119	148	150	143	110	112	101	83
Flaske 4	131	126	135	148	135	122	108	110	84
Flaske 5	141	147	126		143	120	106	124	85
Antall utsådde celler per flaske	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Gjennomsnittlig antall kolonier per flaske: N		136.9	137.2	149.3	141.2	119.6	113	112.6	88.2
$\Delta N$		3.843	4.091	3.902	3.666	2.542	4.359	4.167	3.734
Overlevelsesfraksjon: OF			1.002	1.090	1.031	0.874	0.825	0.822	0.644
$\Delta OF$			0.041	0.042	0.039	0.031	0.039	0.038	0.033
Overlevelsesfraksjon korrigert for multiplisitet: f			1.002	1.090	1.031	0.855	0.802	0.798	0.609
$\Delta f$			0.041	0.042	0.039	0.035	0.044	0.042	0.035

**Forsøk: P6**

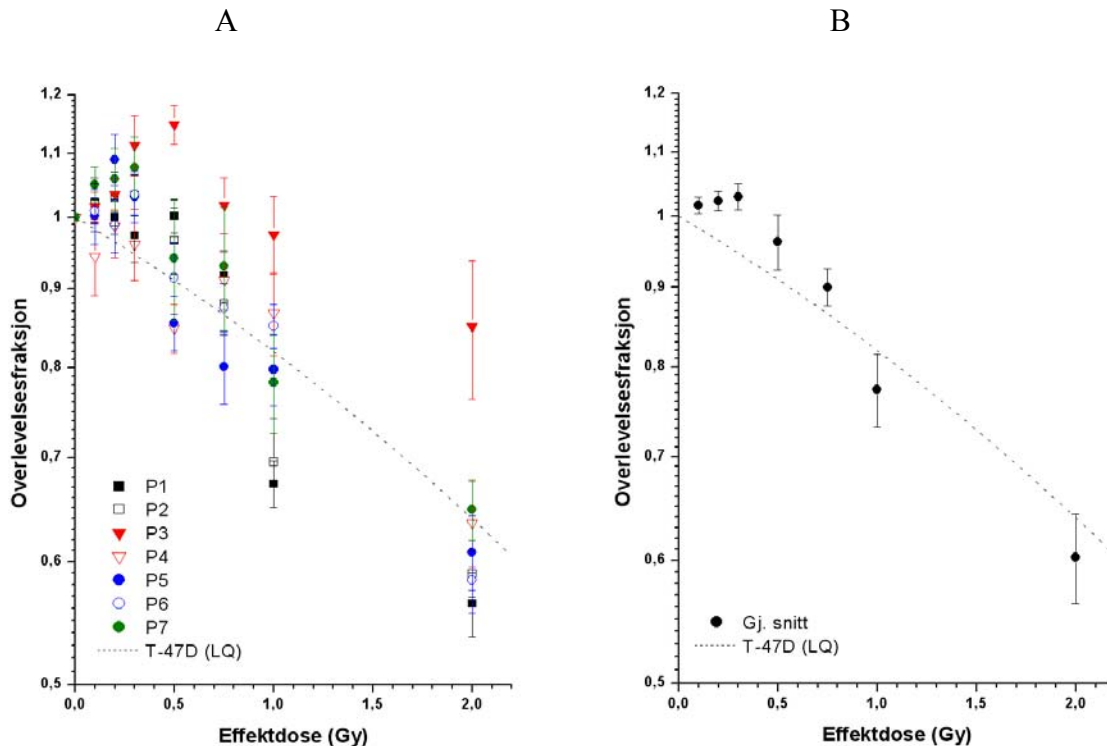
Dato: 18. september 2007

Multiplisitet: M = 1.1487			Plating Efficiency. PE = 1.220						
Dose (Gy)	K	K	0.1	0.2	0.3	0.5	0.75	1	2
Flaske 1	227	253	244	230	247	240	241	231	145
Flaske 2	242	235	249	220	257	234	210	215	165
Flaske 3	264	245		249	275	250	210	204	137
Flaske 4	232	255		250	243	204	215	206	167
Flaske 5	243			259	240	202	211	206	142
Antall utsådde celler per flaske	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Gjennomsnittlig antall kolonier per flaske: N		244	246.5	241.6	252.4	226	217.4	212.4	151.2
$\Delta N$		3.948	2.500	7.174	6.337	9.737	5.972	5.026	6.184
Overlevelsesfraksjon: OF			1.010	0.990	1.034	0.926	0.891	0.870	0.620
$\Delta OF$			0.019	0.033	0.031	0.043	0.028	0.025	0.027
Overlevelsesfraksjon korrigert for multiplisitet: f			1.010	0.988	1.034	0.915	0.875	0.852	0.584
$\Delta f$			0.019	0.039	0.031	0.049	0.032	0.028	0.029

**Forsøk: P7**

Dato: 19. september 2007

Multiplisitet: M = 1.4153			Plating Efficiency. PE = 0.948						
Dose (Gy)	K	K	0.1	0.2	0.3	0.5	0.75	1	2
Flaske 1	189	200	195	210	179	219	179	142	141
Flaske 2	210	198	204	216	214	178	181	161	136
Flaske 3	188	184	199	204	227	168	176	186	155
Flaske 4	165	197	192	169	203	173	156	168	137
Flaske 5	176	188	205	204	198	176	215	152	135
Antall utsådde celler per flaske	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Gjennomsnittlig antall kolonier per flaske: N		189.5	199	200.6	204.2	182.8	181.4	161.8	140.8
$\Delta N$		4.050	2.510	8.207	8.034	9.205	9.511	7.459	3.693
Overlevelsesfraksjon: OF			1.050	1.059	1.078	0.965	0.957	0.854	0.743
$\Delta OF$			0.026	0.049	0.048	0.053	0.054	0.043	0.025
Overlevelsesfraksjon korrigert for multiplisitet: f			1.050	1.059	1.078	0.942	0.930	0.783	0.648
$\Delta f$			0.026	0.049	0.048	0.083	0.084	0.057	0.030



**Figur C.3: Overlevelsesfraksjoner (A) og gjennomsnittlige overlevelsesfraksjoner (B) som funksjon av effektdose (rtg) levert T-47D-celler primet med  $[^{60}\text{Co}]\gamma$ -stråling.**

Datapunktene representerer overlevelsesfraksjoner (A) og overlevelsesfraksjonenes middelerverdi (B), samt tilhørende standardfeil, for forsøk P1-P7, med T-47D-celler eksponert for en 0.3 Gy primingdosen før effektdosen. Primingdosen ble levert 17.08.2005 ved lav doserate  $[^{60}\text{Co}]\gamma$ -stråling (0.3 Gy/time) av Nina Edin, mens effektdosen ble levert ved akutt røntgenstråling med doserate 30 Gy/time. Middelerverdiene i plott B ble beregnet ved å vekte overlevelsesfraksjonene i plott A etter standardfeilen i hvert forsøk. Både overlevelsesfraksjonene (A) og middelerverdiene (B) er plottet mot en tilpasning ved minste kvadrert metode til LQ-modellen (kapittel 2.3.2, s.18) for effektbestrålte, dvs. uprimede T-47D-celler etter eksperimenter utført av Edin (upublisert, personlig meddelelse)

## Vedlegg D: Filmforsøk

### I Observasjonsskjema

De kolonidannende enhetenes utvikling til koloni (eller kolonier eller mangelen på koloni) ble dokumentert i observasjonsskjemaer ved en rekke ulike parametere (se kolonne 1 i skjemaene). Hvert observasjonsskjema gjengir observasjoner fra 1 celleflaske, dvs. filmer fra 3 bildesnitt. Opprinnelig ble to celleflasker filmet mot hverandre i hvert forsøk. For å presentere dataene på en oversiktlig måte har jeg valgt å gruppere observasjonsskjemaene etter filmet cellepopulasjoner. Flasker som er filmet sammen har samme forsøksperiode.

Observasjonsskjemaene for like cellepopulasjoner er gruppert sammen og skjemaene innad i gruppen er ordnet kronologisk (etter dato).

# T-47D, ubestrålt

19.03.07 - 26.03.07

Delforsøk	D0	D1	D2	Sum
<b>Start og sluttinfo</b>				
<b>Startinfo</b>				
Antall enkeltceller	9	10	6	25
Antall dubletter	3	3	1	7
Antall tripler+	0	0	0	0
Totalt antall startgrupper	12	13	7	32
<b>Sluttinfo</b>				
Antall enkeltceller	1	0	0	1
Antall kolonier (stabile kolonier)	9	7	7	23
Antall strengkolonier (ustabile kolonier)	1	3	0	4
Totalt antall sluttgrupper	11	10	7	28
<b>Mediumskift</b>				
Før mediumskift				
Antall enkeltceller	1	0	0	1
Antall kolonier	9	9	7	25
Antall strengkolonier	1	3	0	4
Totalt	11	12	7	30
Etter mediumskift				
Antall enkeltceller	1	0	0	1
Antall kolonier	9	8	7	24
Antall strengkolonier	1	4	0	5
Totalt	11	12	7	30
Antall bortfalte enkeltceller	0	0	0	0
Antall bortfalte kolonier	0	1	0	1
Antall bortfalte strengkolonier	0	-1	0	-1
Totalt antall bortfalte celler	0	0	0	0
Antall enkeltceller in i bildet under mediumskift				0
Antall kolonier inn i bildet under mediumskift				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner koloni				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner ikke koloni				0
Antall spellegg		2		2
<b>Koloni</b>	1	1	1	23
<b>Strengkoloni</b>	1	1	1	4
<b>Enkeltcelle</b>	1	1	1	1
<b>Kolonien opphav</b>				0
Enkeltcelle	1	1	1	23
Enkeltcelle fra oppsplittet startdublett				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett, oppr. En celle				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett, oppr. To enkeltceller				0
Enkeltcelle utsendt fra koloni				0
3 generasjon enkeltcelle fra oppsplittet startdublett				0
Dublett	1	1	1	7
Triplet+				0
Enkeltcelle inn i bildet/ under mediumskift	1			1
Koloni som kommer inn fra mediumskift				0
<b>Antall kolonidelinger</b>	3	2		5
Kolonien stabiliseres				0
Kolonien blir ustabil	6			6
Kolonienes stabilitet endres ikke		4		4
Celleansamling danner egen koloni				0
Celleansamlingene gror sammen, kolonien stabiliseres				0
Celleansamlingene gror sammen, kolonien blir ustabil				0
Celleansamlingene gror sammen, koloniens stabilitet endres ikke	6	4		10
Celleansamling gror sammen med annen koloni				0
<b>Antall celler morkolonien sender ut</b>	5			5
Morkolonien stabiliseres				0
Morkolonien blir ustabil	5			5
Morkolonien stabilitet endres ikke				0
Cellen danner egen koloni				0
Cellen danner egen strengkoloni				0
Datterkolonien gror sammen med mor, mor stabiliseres				0
Datterkolonien gror sammen med mor, mor blir ustabil				0
Datterkolonien gror sammen med mor, mors stabilitet endres ikke	5			5
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien stabiliseres				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien blir ustabil				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, koloniens stabilitet endres ikke				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabiliseres				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor blir ustabil				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabilitet endres ikke				0
Cellen finner ingen match/ deler seg ikke				0
Cellen danner vandrende kompleks				0
Cellen migrerer ut av bilde				0
Uvisst hva som skjer med cellen, filmen slutter				0
<b>Antall ikke-familære celler kolonien tar inn</b>				0
Morkolonien stabiliseres				0
Morkolonien blir ustabil				0
Morkolonien stabilitet endres ikke				0
Enkeltcelle, start				0
Enkeltcelle som kommer inn i bildet				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett				0
Enkeltcelle utsendt fra koloni				0
Enkeltcelle utsendt fra strengkoloni				0
Vandrene celle/kompleks				0

26.03.07 - 02.04.07

Delforsøk	D0	D1	D2	Sum
<b>Start og slutinfo</b>				
<b>Startinfo</b>				
Antall enkeltceller	7	6	14	27
Antall dubletter	1	0	3	4
Antall tripletter+	1	1	0	2
Totalt antall startgrupper	9	7	17	33
<b>Sluttinfo</b>				
Antall enkeltceller	0	0	1	1
Antall kolonier (stabile kolonier)	6	5	10	21
Antall strengkolonier (ustabile kolonier)	2	2	0	4
Totalt antall sluttgrupper	8	7	11	26
<b>Mediumskift</b>				
Før mediumskift				
Antall enkeltceller	0	0	2	2
Antall kolonier	7	7	12	26
Antall strengkolonier	0	0	0	0
Totalt	7	7	14	28
Etter mediumskift				
Antall enkeltceller	0	0	0	0
Antall kolonier	7	7	12	26
Antall strengkolonier	0	0	0	0
Totalt	7	7	12	26
Antall bortfalte enkeltceller	0	0	2	2
Antall bortfalte kolonier	0	0	0	0
Antall bortfalte strengkolonier	0	0	0	0
Totalt antall bortfalte celler	0	0	2	2
Antall enkeltceller in i bildet under mediumskift				0
Antall kolonier inn i bildet under mediumskift				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner koloni				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner ikke koloni				0
Antall speilegg				0
<b>Kolonisens opphav</b>				
Enkeltcelle	1 1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1 1	1 2 1 1 1 2 2 1 1	25
Enkeltcelle fra oppsplittet startdublett				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett, oppr. En celle				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett, oppr. To enkeltceller				0
Enkeltcelle utsendt fra koloni				0
3.generasjon enkeltcelle fra oppsplittet startdublett				0
Dublett				4
Triplet+	1		1	2
Enkeltcelle inn i bildet/ under mediumskift		1	1	0
Koloni som kommer inn fra mediumskift				0
<b>Antall kolonidelinger</b>				
Kolonien stabiliseres				0
Kolonien blir ustabil				0
Kolonienes stabilitet endres ikke				0
Celleansamling danner egen koloni				0
Celleansamlingene gror sammen, kolonien stabiliseres				0
Celleansamlingene gror sammen, kolonien blir ustabil				0
Celleansamlingene gror sammen, koloniens stabilitet endres ikke				0
Celleansamling gror sammen med annen koloni				0
<b>Antall celler morkolonien sender ut</b>	1	1		2
Morkolonien stabiliseres				0
Morkolonien blir/forblir ustabil				0
Morkoloniens stabilitet endres ikke	1	1		2
Cellen danner egen koloni				0
Cellen danner egen strengkoloni				0
Datterkolonien gror sammen med mor, mor stabiliseres				0
Datterkolonien gror sammen med mor, mor blir ustabil				0
Datterkolonien gror sammen med mor, mors stabilitet endres ikke				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien stabiliseres				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien blir ustabil		1		1
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, koloniens stabilitet endres ikke				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabiliseres				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor blir ustabil				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabilitet endres ikke				0
Cellen finner ingen match/ deler seg ikke	1			1
Cellen danner vandrende kompleks				0
Cellen migrerer ut av bilde				0
Uvisst hva som skjer med cellen, filmen slutter				0
<b>Antall ikke-familære celler kolonien tar inn</b>		1		1
Morkolonien stabiliseres				0
Morkolonien blir ustabil		1		1
Morkoloniens stabilitet endres ikke				0
Enkeltcelle, start				0
Enkeltcelle som kommer inn i bildet				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett				0
Enkeltcelle utsendt fra koloni				0
Enkeltcelle utsendt fra strengkoloni		1		1
Vandrene celle/kompleks				0



09.04.07 – 16.04.07

[illegible]

16.04.07 - 23.04.07

Delforsøk	K0	K1	K2	Sun
<b>Start og sluttinfo</b>				
<b>Startinfo</b>				
Antall enkeltceller	9	11	8	28
Antall dubletter	4	3	4	11
Antall tripletter+	2	1	2	5
Totalt antall startgrupper	15	15	14	44
<b>Sluttinfo</b>				
Antall enkeltceller	0	1	1	2
Antall kolonier	16	12	13	41
Antall strengkolonier	0	0	0	0
Totalt antall sluttgurper	16	13	14	43
<b>Mediumskift</b>				
Før mediumskift				
Antall enkeltceller	1	2	3	6
Antall kolonier	14	15	11	40
Antall strengkolonier	1	0	0	1
Totalt	16	17	14	47
Etter mediumskift				
Antall enkeltceller	0	1	2	3
Antall kolonier	14	15	11	40
Antall strengkolonier	1	0	0	1
Totalt	15	16	13	44
Antall bortfalte enkeltceller	1	1	1	3
Antall bortfalte kolonier	0	0	0	0
Antall bortfalte strengkolonier	0	0	0	0
Totalt antall bortfalte celler	1	1	1	3
Antall enkeltceller in i bildet under mediumskift				0
Antall kolonier inn i bildet under mediumskift				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner koloni				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner ikke koloni				0
Antall speilegg		1		1
<b>Koloni</b>	1 1 2 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	1 1 2 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	41
<b>Strengkoloni</b>				0
<b>Enkeltcelle</b>	1		1	2
<b>Koloniens opphav</b>				
Enkeltcelle	1	1	1	3
Enkeltcelle fra oppsplittet startdublett	1	1	1	3
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett, oppr. En celle	1	1	1	3
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett, oppr. To enkeltceller	1	1	1	3
Enkeltcelle utsendt fra koloni	1	1	1	3
3.generasjon enkeltcelle fra oppsplittet startdublett	1	1	1	3
Dublett	1	1	1	3
Triplet+	1	1	1	3
Enkeltcelle inn i bildet/ under mediumskift	1	1	1	3
Koloni som kommer inn fra mediumskift	1	1	1	3
<b>Antall kolonidelinger</b>				
Kolonien stabiliseres	1	1	1	3
Kolonien blir ustabil*	2	1	1	4
Koloniens stabilitet endres ikke			2	2
Celleansamling danner egen koloni	2		2	4
Celleansamlingene gror sammen, kolonien stabiliseres		2		2
Celleansamlingene gror sammen, kolonien blir ustabil				0
Celleansamlingene gror sammen, koloniens stabilitet endres ikke				0
Celleansamling gror sammen med annen koloni				0
<b>Antall celler morkolonien sender ut</b>				
Morkolonien stabiliseres	1	1		2
Morkolonien blir ustabil		1		1
Morkoloniens stabilitet endres ikke	1			1
Cellen danner egen koloni				0
Cellen danner egen strengkolonikoloni				0
Datterkolonien gror sammen med mor, mor stabiliseres				0
Datterkolonien gror sammen med mor, mor blir ustabil		1		1
Datterkolonien gror sammen med mor, mors stabilitet endres ikke				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien stabiliseres				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien blir ustabil				1
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, koloniens stabilitet endres ikke	1			1
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabiliseres				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor blir ustabil				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabilitet endres ikke				0
Cellen finner ingen match/ deler seg ikke				0
Cellen danner vandrende kompleks				0
Cellen migrerer ut av bilde				0
Uvisst hva som skjer med cellen, filmen slutter				0
<b>Antall ikke-familære celler kolonien tar inn</b>				
Morkolonien stabiliseres	1			1
Morkolonien blir ustabil				0
Morkoloniens stabilitet endres ikke	1			1
Enkeltcelle, start				0
Enkeltcelle som kommer inn i bildet				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett				1
Enkeltcelle utsendt fra koloni	1			1
Enkeltcelle uts2				0
Vandrene celle/kompleks				0

23.04.07 - 30.04.07

Delforsøk	K0	K1	K2	Sum
<b>Start og sluttinfo</b>				
<b>Startinfo</b>				
Antall enkeltceller	8	3	13	24
Antall dubletter	1	5	3	9
Antall tripletter+	1	0	0	1
Totalt antall startgrupper	10	8	16	34
<b>Sluttinfo</b>				
Antall enkeltceller	0	0	0	0
Antall kolonier (stabile kolonier)	10	8	11	29
Antall strengkolonier (ustabile kolonier)	0	0	0	0
Totalt antall sluttgrupper	10	8	11	29
<b>Mediumskift</b>				
Før mediumskift				
Antall enkeltceller	0	0	5	5
Antall kolonier	10	8	11	29
Antall strengkolonier	0	0	0	0
Totalt	10	8	16	34
Etter mediumskift				
Antall enkeltceller	0	0	0	0
Antall kolonier	10	8	11	29
Antall strengkolonier	0	0	0	0
Totalt	10	8	11	29
Antall bortfalte enkeltceller	0	0	5	5
Antall bortfalte kolonier	0	0	0	0
Antall bortfalte strengkolonier	0	0	0	0
Totalt antall bortfalte celler	0	0	5	5
Antall enkeltceller in i bildet under mediumskift				
Antall kolonier inn i bildet under mediumskift				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner koloni				
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner ikke koloni				0
Antall speilegg				
				0
<b>Koloni</b>	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 2 1 1 1	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	29
<b>Strengkoloni</b>				0
<b>Enkeltcelle</b>				0
<b>Kolonien opphav</b>				
Enkeltcelle	1 1 1 1 1 1 1 1	1 1	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	19
Enkeltcelle fra oppsplittet startdublett				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett, oppr. En celle				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett, oppr. To enkeltceller		2		2
Enkeltcelle utsendt fra koloni (egen bolk)				0
3.generasjon enkeltcelle fra oppsplittet startdublett				0
Dublett	1	1 1 1	1 1 1	7
Triplet+	1			1
Enkeltcelle inn i bildet/ under mediumskift				0
Koloni som kommer inn fra mediumskift				0
<b>Antall kolonidelinger</b>				
Kolonien stabiliseres		1		1
Kolonien blir ustabil*				0
Kolonien stabilitet endres ikke		2		2
Celleansamling danner egen koloni				
Celleansamlingene gror sammen, kolonien stabiliseres				0
Celleansamlingene gror sammen, kolonien blir ustabil		2		2
Celleansamlingene gror sammen, koloniens stabilitet endres ikke				0
Celleansamling gror sammen med annen koloni				0
<b>Antall celler morkolonien sender ut</b>				
Morkolonien stabiliseres		1		1
Morkolonien blir ustabil		1		0
Morkolonien stabilitet endres ikke				0
Cellen danner egen koloni				
Cellen danner egen strengkolonikoloni				0
Datterkolonien gror sammen med mor, mor stabiliseres				
Datterkolonien gror sammen med mor, mor blir ustabil				0
Datterkolonien gror sammen med mor, mors stabilitet endres ikke		1		1
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien stabiliseres				
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien blir ustabil				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, koloniens stabilitet endres ikke				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabiliseres				
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor blir ustabil				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabilitet endres ikke				0
Cellen finner ingen match/ deler seg ikke				
Cellen danner vandrende kompleks				0
Cellen migrerer ut av bilde				0
Uvisst hva som skjer med cellen, filmen slutter				0
<b>Antall ikke-familære celler kolonien tar inn</b>				
Morkolonien stabiliseres				0
Morkolonien blir ustabil				0
Morkolonien stabilitet endres ikke				0
Enkeltcelle, start				
Enkeltcelle som kommer inn i bildet				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett				0
Enkeltcelle utsendt fra koloni				0
Enkeltcelle utsendt fra strengkoloni				0
Vandrende celle/kompleks				0

29.10.07 - 05.11.07

Delforsøk	K0	K1	K2	Sum
<b>Start og sluttinfo</b>				
<b>Startinfo</b>				
Antall enkeltceller	7	9	9	25
Antall dubletter	2	2	1	5
Antall tripler+	1	0	0	1
Totalt antall startgrupper	10	11	10	31
<b>Sluttinfo</b>				
Antall enkeltceller	0	0	1	1
Antall kolonier (stabile kolonier)	8	10	10	28
Antall strengkolonier (ustabile kolonier)	0	0	0	0
Totalt antall sluttgrupper	8	10	11	29
<b>Mediumskift</b>				
Før mediumskift				
Antall enkeltceller	1	1	2	4
Antall kolonier	9	11	8	28
Antall strengkolonier	0	0	0	0
Totalt	10	12	10	32
Etter mediumskift				
Antall enkeltceller	1	1	2	4
Antall kolonier	9	11	8	28
Antall strengkolonier	0	0	0	0
Totalt	10	12	10	32
Antall bortfalte enkeltceller	0	0	0	0
Antall bortfalte kolonier	0	0	0	0
Antall bortfalte strengkolonier	0	0	0	0
Totalt antall bortfalte celler	0	0	0	0
Antall enkeltceller in i bildet under mediumskift				0
Antall kolonier inn i bildet under mediumskift				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner koloni				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner ikke koloni				0
Antall speilegg	1	1		2
<b>Koloni</b>	1 1 1 1 1 1 1	1 1 1 2 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1 1 2 1 1	28
<b>Strengkoloni</b>				0
<b>Enkeltcelle</b>			1	1
<b>Kolonis opphav</b>				
Enkeltcelle	1	1 1 1 2	1 1 1 1 1 1 1 1 1	22
Enkeltcelle fra oppsplittet startdublett				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett, oppr. En celle	1			1
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett, oppr. To enkeltceller			2	2
Enkeltcelle utsendt fra koloni (egen bolk)				0
3.generasjon enkeltcelle fra oppsplittet startdublett				0
Dublett	1	1	1	4
Triplet+				1
Enkeltcelle inn i bildet/ under mediumskift				0
Koloni som kommer inn fra mediumskift				0
<b>Antall kolonidelinger</b>		1		1
Kolonien stabiliseres		2		2
Kolonien blir ustabil*				0
Kolonis stabilitet endres ikke				0
Celleansamling danner egen koloni		2		2
Celleansamlingene gror sammen, kolonien stabiliseres				0
Celleansamlingene gror sammen, kolonien blir ustabil				0
Celleansamlingene gror sammen, kolonis stabilitet endres ikke				0
Celleansamling gror sammen med annen koloni				0
<b>Antall celler morkolonien sender ut</b>			2	2
Morkolonien stabiliseres			1	1
Morkolonien blir ustabil				0
Morkolonis stabilitet endres ikke			1	1
Cellen danner egen koloni				0
Cellen danner egen strengkolonikoloni				0
Datterkolonien gror sammen med mor, mor stabiliseres				0
Datterkolonien gror sammen med mor, mor blir ustabil				0
Datterkolonien gror sammen med mor, mors stabilitet endres ikke				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien stabiliseres				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien blir ustabil				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonis stabilitet endres ikke				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabiliseres				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor blir ustabil				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabilitet endres ikke				0
Cellen finner ingen match/ deler seg ikke			2	2
Cellen danner vandrende kompleks				0
Cellen migrerer ut av bilde				0
Uvisst hva som skjer med cellen, filmen slutter				0
<b>Antall ikke-familære celler kolonien tar inn</b>				0
Morkolonien stabiliseres				0
Morkolonien blir ustabil				0
Morkolonis stabilitet endres ikke				0
Enkeltcelle, start				0
Enkeltcelle som kommer inn i bildet				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett				0
Enkeltcelle utsendt fra koloni				0
Enkeltcelle utsendt fra strengkoloni				0
Vandrende celle/kompleks				0

06.11.07 - 13.11.07

Delforsøk	K0										K1										K2										Sum
<b>Start og sluttinfo</b>																															
<b>Startinfo</b>																															
Antall enkeltceller	4										12										9										25
Antall dubletter	2										1										2										5
Antall tripletter+	3										2										1										6
Totalt antall startgrupper	9										15										12										36
<b>Sluttinfo</b>																															
Antall enkeltceller	0										0										0										0
Antall kolonier (stabile kolonier)	6										9										10										25
Antall strengkolonier (ustabile kolonier)	0										0										0										0
Totalt antall sluttgrupper	6										9										10										25
<b>Mediumskift</b>																															
Før mediumskift																															
Antall enkeltceller	2										3										3										8
Antall kolonier	6										10										9										25
Antall strengkolonier	0										0										0										0
Totalt	8										13										12										33
Etter mediumskift																															
Antall enkeltceller	0										0										2										2
Antall kolonier	6										10										9										25
Antall strengkolonier	0										0										0										0
Totalt	6										10										11										27
Antall bortfalte enkeltceller	2										3										1										6
Antall bortfalte kolonier	0										0										0										0
Antall bortfalte strengkolonier	0										0										0										0
Totalt antall bortfalte celler	2										3										1										6
Antall enkeltceller in i bildet under mediumskift																									0						
Antall kolonier inn i bildet under mediumskift																									0						
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner koloni																									0						
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner ikke koloni																									0						
Antall speilegg																									2						
1 1																									25						
<b>Koloni</b>																									0						
<b>Strengkoloni</b>																									0						
<b>Enkeltcelle</b>																									0						
<b>Koloniens opphav</b>																															
Enkeltcelle	1										1										1 1 2 2 1 1										17
Enkeltcelle fra oppsplittet startdublett																					1 1 1 1 1 1 1 1										0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett, oppr. En celle																															0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett, oppr. To enkeltceller																															0
Enkeltcelle utsendt fra koloni (egen bolk																															0
3 generasjon enkeltcelle fra oppsplittet startdublett																															0
Dublett	1 1 1 1																				1 1										5
Triplet+											1 1 1										1										6
Enkeltcelle inn i bildet/ under mediumskift																					1										0
Koloni som kommer inn fra mediumskift																															0
<b>Antall kolonidelinger</b>																									1						
Kolonien stabiliseres																															0
Kolonien blir ustabil*																															0
Koloniens stabilitet endres ikke	2																														2
Celleansamling danner egen koloni																									0						
Celleansamlingene gror sammen, kolonien stabiliseres																									0						
Celleansamlingene gror sammen, kolonien blir ustabil																									0						
Celleansamlingene gror sammen, koloniens stabilitet endres ikke																									2						
Celleansamling gror sammen med annen koloni																									0						
<b>Antall celler morkolonien sender ut</b>																									0						
Morkolonien stabiliseres																									0						
Morkolonien blir ustabil																									0						
Morkoloniens stabilitet endres ikke																									0						
Cellen danner egen koloni																									0						
Cellen danner egen strengkolonikoloni																									0						
Datterkolonien gror sammen med mor, mor stabiliseres																									0						
Datterkolonien gror sammen med mor, mor blir ustabil																									0						
Datterkolonien gror sammen med mor, mors stabilitet endres ikke																									0						
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien stabiliseres																									0						
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien blir ustabil																									0						
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, koloniens stabilitet endres ikke																									0						
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabiliseres																									0						
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor blir ustabil																									0						
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabilitet endres ikke																									0						
Cellen finner ingen match/ deler seg ikke																									0						
Cellen danner vandrende kompleks																									0						
Cellen migrerer ut av bilde																									0						
Uvisst hva som skjer med cellen, filmen slutter																									0						
<b>Antall ikke-familære celler kolonien tar inn</b>																									0						
Morkolonien stabiliseres																									0						
Morkolonien blir ustabil																									0						
Morkoloniens stabilitet endres ikke																									0						
Enkeltcelle, start																									0						
Enkeltcelle som kommer inn i bildet																									0						
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett																									0						
Enkeltcelle utsendt fra koloni																									0						
Enkeltcelle utsendt fra strengkoloni																									0						
Vandrene celle/kompleks																									0						

# T-47D, ingen priming, 0.3 Gy effektdose

09.04.07 - 16.04.07

Delforsøk	B0	B1	B2	Sum
<b>Start og sluttinfo</b>				
<b>Startinfo</b>				
Antall enkeltceller	6	5	4	15
Antall dubletter	4	4	6	14
Antall trippletter+	2	0	1	3
Totalt antall startgrupper	12	9	11	32
<b>Sluttinfo</b>				
Antall enkeltceller	0	0	0	0
Antall kolonier	10	6	10	26
Antall strengkolonier	0	2	0	2
Totalt antall sluttgrupper	10	8	10	28
<b>Mediumskift</b>				
Før mediumskift				
Antall enkeltceller	0	0	0	0
Antall kolonier	11	9	11	31
Antall strengkolonier	0	0	0	0
Totalt	11	9	11	31
Etter mediumskift				
Antall enkeltceller	0	0	0	0
Antall kolonier	10	8	11	29
Antall strengkolonier	0	0	0	0
Totalt	10	8	11	29
Antall bortfalte enkeltceller	0	0	0	0
Antall bortfalte kolonier	1	1	0	2
Antall bortfalte strengkolonier	0	0	0	0
Totalt antall bortfalte celler	1	1	0	2
Antall enkeltceller in i bildet under mediumskift				0
Antall kolonier inn i bildet under mediumskift				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner koloni				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner ikke koloni				0
Antall speilegg			1	1
<b>Koloni</b>	1 1 1 1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	26
<b>Strengkoloni</b>		1		2
<b>Enkeltcelle</b>				0
<b>Kolonis opphav</b>				0
Enkeltcelle	1 2 1 1	1 1	1 1 1 1 1	12
Enkeltcelle fra oppsplittet startdublett				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett, oppr. En celle				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett, oppr. To enkeltceller				0
Enkeltcelle utsendt fra koloni				0
3. generasjon enkeltcelle fra oppsplittet startdublett				14
Dublett	1	1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1 1	3
Tripplet+			1	0
Enkeltcelle inn i bildet/ under mediumskift				1
Koloni som kommer inn fra mediumskift			1	
<b>Antall kolonidelinger</b>	1			1
Kolonien stabiliseres				0
Kolonien blir ustabil*				0
Kolonis stabilitet endres ikke	2			2
Celleansamling danner egen koloni				0
Celleansamlingene gror sammen, kolonien stabiliseres				0
Celleansamlingene gror sammen, kolonien blir ustabil				0
Celleansamlingene gror sammen, kolonis stabilitet endres ikke	2			2
Celleansamling gror sammen med annen koloni				0
<b>Antall celler morkolonien sender ut</b>		1		1
Morkolonien stabiliseres				0
Morkolonien blir ustabil				0
Morkolonis stabilitet endres ikke		1		1
Cellen danner egen koloni				0
Cellen danner egen strengkolonikoloni				0
Datterkolonien gror sammen med mor, mor stabiliseres				0
Datterkolonien gror sammen med mor, mor blir ustabil				0
Datterkolonien gror sammen med mor, mors stabilitet endres ikke				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien stabiliseres				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien blir ustabil				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonis stabilitet endres ikke				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabiliseres				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor blir ustabil		1		1
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabilitet endres ikke				0
Cellen finner ingen match/ deler seg ikke				0
Cellen danner vandrende kompleks				0
Cellen migrerer ut av bilde				0
Uvisst hva som skjer med cellen, filmen slutter				0
<b>Antall ikke-familære celler kolonien tar inn</b>				0
Morkolonien stabiliseres				0
Morkolonien blir ustabil				0
Morkolonis stabilitet endres ikke				0
Enkeltcelle, start				0
Enkeltcelle som kommer inn i bildet				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett				0
Enkeltcelle utsendt fra koloni				0
Enkeltcelle utsendt fra strengkoloni				0
Vandrene celle/kompleks				0

16.04.07 - 23.04.07

Delforsøk	B0	B1	B2	Sum
<b>Start og sluttinfo</b>				
<b>Startinfo</b>				
Antall enkeltceller	11	11	11	33
Antall dubletter	3	1	5	9
Antall tripler+	2	2	1	5
Totalt antall startgrupper	16	14	17	47
<b>Sluttinfo</b>				
Antall enkeltceller	0	0	0	0
Antall kolonier	14	9	15	38
Antall strengkolonier	0	3	1	4
Totalt antall sluttgrupper	14	12	16	42
<b>Mediumskift</b>				
Før mediumskift				
Antall enkeltceller	3	4	1	8
Antall kolonier	13	11	16	40
Antall strengkolonier	0	0	0	0
Totalt	16	15	17	48
Etter mediumskift				
Antall enkeltceller	2	2	1	5
Antall kolonier	13	10	15	38
Antall strengkolonier	0	0	0	0
Totalt	15	12	16	43
Antall bortfalte enkeltceller	1	2	0	3
Antall bortfalte kolonier	0	1	1	2
Antall bortfalte strengkolonier	0	0	0	0
Totalt antall bortfalte celler	1	3	1	5
Antall enkeltceller in i bildet under mediumskift				0
Antall kolonier inn i bildet under mediumskift				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner koloni				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner ikke koloni				0
Antall spilllegg				0
<b>Koloni</b>	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 2 1 1 1	1 1 1 1 1 1 2 1 1 1 1 1 1	38
<b>Strengkoloni</b>		1 1	1	4
<b>Enkeltcelle</b>				0
<b>Koloniens opphav</b>				
Enkeltcelle	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 2 1 1 1 1 1 1	29
Enkeltcelle fra oppsplittet startdublett				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett, oppr. En celle				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett, oppr. To enkeltceller				0
Enkeltcelle utsendt fra koloni				0
3.generasjon enkeltcelle fra oppsplittet startdublett				0
Dublett	1 1 1 1 1	1 1	1 1	8
Triplet+		1 1 1	1 1	5
Enkeltcelle inn i bildet/ under mediumskift				0
Koloni som kommer inn fra mediumskift				0
<b>Antall kolonidelinger</b>		1		1
Kolonien stabiliseres				0
Kolonien blir ustabil*				0
Koloniens stabilitet endres ikke		2		2
Celleansamling danner egen koloni		2		2
Celleansamlingene gror sammen, kolonien stabiliseres				0
Celleansamlingene gror sammen, kolonien blir ustabil				0
Celleansamlingene gror sammen, koloniens stabilitet endres ikke				0
Celleansamling gror sammen med annen koloni				0
<b>Antall celler morkolonien sender ut</b>	1	1	2	4
Morkolonien stabiliseres			2	2
Morkolonien blir ustabil	1			1
Morkoloniens stabilitet endres ikke		1		1
Cellen danner egen koloni			1	1
Cellen danner egen strengkolonikoloni				0
Datterkolonien gror sammen med mor, mor stabiliseres				0
Datterkolonien gror sammen med mor, mor blir ustabil	1			1
Datterkolonien gror sammen med mor, mors stabilitet endres ikke			1	1
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien stabiliseres				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien blir ustabil				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, koloniens stabilitet endres ikke		1		1
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabiliseres				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor blir ustabil				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabilitet endres ikke				0
Cellen finner ingen match/ deler seg ikke				0
Cellen danner vandrende kompleks				0
Cellen migrerer ut av bilde				0
Uvisst hva som skjer med cellen, filmen slutter				0
<b>Antall ikke-familære celler kolonien tar inn</b>		1		1
Morkolonien stabiliseres				0
Morkolonien blir ustabil				0
Morkoloniens stabilitet endres ikke		1		1
Enkeltcelle, start				0
Enkeltcelle som kommer inn i bildet				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett				0
Enkeltcelle utsendt fra koloni				0
Enkeltcelle utsendt fra strengkoloni		1		1
Vandrende celler/kompleks		1		1

23.04.07 - 30.04.07

Delforsøk	B0	B1	B2	Sum
<b>Start og sluttinfo</b>				
<b>Startinfo</b>				
Antall enkeltceller	14	9	4	27
Antall dubletter	1	5	1	7
Antall tripletter+	0	0	2	2
Totalt antall startgrupper	15	14	7	36
<b>Sluttinfo</b>				
Antall enkeltceller	0	1	0	1
Antall kolonier (stabile kolonier)	7	10	10	27
Antall strengkolonier (ustabile kolonier)	3	0	0	3
Totalt antall sluttgrupper	10	11	10	31
<b>Mediumskift</b>				
Før mediumskift				
Antall enkeltceller	2	2	1	5
Antall kolonier	10	10	5	25
Antall strengkolonier	1	0	3	4
Totalt	13	12	9	34
Etter mediumskift				
Antall enkeltceller	0	1	1	2
Antall kolonier	9	9	5	23
Antall strengkolonier	1	1	3	5
Totalt	10	11	9	30
Antall bortfalte enkeltceller	2	1	0	3
Antall bortfalte kolonier	1	1	0	2
Antall bortfalte strengkolonier	0	-1	0	-1
Totalt antall bortfalte celler	3	1	0	4
Antall enkeltceller in i bildet under mediumskift				0
Antall kolonier inn i bildet under mediumskift				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner koloni				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner ikke koloni				0
Antall spellegg	1		1	2
<b>Koloni</b>	1 1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	1 2 1 1 1 1 1 1 1	27
<b>Strengkoloni</b>	1 1			3
<b>Enkeltcelle</b>		1		1
<b>Koloniens opphav</b>				
Enkeltcelle	1 3 1	1 1 1 1 1	1 1 1	22
Enkeltcelle fra oppsplittet startdublett		1 1		0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett, oppr. En celle				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett, oppr. To enkeltceller				0
Enkeltcelle utsendt fra koloni (egen bolk)			1	1
3.generasjon enkeltcelle fra oppsplittet startdublett			1 1 1 1	4
Dublett	1	1 1 1 1 1	1	6
Triplet+				2
Enkeltcelle inn i bildet/ under mediumskift				1
Koloni som kommer inn fra mediumskift				0
<b>Antall kolonidelinger</b>		1	1 2 1	5
Kolonien stabiliseres		1		1
Kolonien blir ustabil*		1		1
Koloniens stabilitet endres ikke			2 4 2	8
Celleansamling danner egen koloni			2	2
Celleansamlingene gror sammen, kolonien stabiliseres				2
Celleansamlingene gror sammen, kolonien blir ustabil			2	0
Celleansamlingene gror sammen, koloniens stabilitet endres ikke		2	4	6
Celleansamling gror sammen med annen koloni				0
<b>Antall celler morkolonien sender ut</b>			2 1 1	4
Morkolonien stabiliseres			1 1	2
Morkolonien blir ustabil				0
Morkoloniens stabilitet endres ikke			1 1	2
Cellen danner egen koloni				0
Cellen danner egen strengkolonikoloni				0
Datterkolonien gror sammen med mor, mor stabiliseres			1	1
Datterkolonien gror sammen med mor, mor blir ustabil				0
Datterkolonien gror sammen med mor, mors stabilitet endres ikke			1	1
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien stabiliseres				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien blir ustabil				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, koloniens stabilitet endres ikke				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabiliseres				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor blir ustabil				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabilitet endres ikke				0
Cellen finner ingen match/ deler seg ikke			1	1
Cellen danner vandrende kompleks				0
Cellen migrerer ut av bilde				0
Uvisst hva som skjer med cellen, filmen slutter			1	1
<b>Antall ikke-familære celler kolonien tar inn</b>				0
Morkolonien stabiliseres				0
Morkolonien blir ustabil				0
Morkoloniens stabilitet endres ikke				0
Enkeltcelle, start				0
Enkeltcelle som kommer inn i bildet				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett				0
Enkeltcelle utsendt fra koloni				0
Enkeltcelle utsendt fra strengkoloni				0
Vandrene celle/kompleks				0



24.09.07 - 01.10.07

Delforsøk	D0					D1		D2					Sum
Start og sluttinfo													
Startinfo													
Antall enkeltceller	12					3		8					23
Antall dubletter	2					0		1					3
Antall tripletter+	1					2		3					6
Totalt antall startgrupper	15					5		12					32
Sluttinfo													
Antall enkeltceller	0					0		0					0
Antall kolonier (stabile kolonier)	8					2		9					19
Antall strengkolonier (ustabile kolonier)	1					1		0					2
Totalt antall sluttgrupper	9					3		9					21
Mediumskift													
Før mediumskift													
Antall enkeltceller	6					2		2					10
Antall kolonier	9					3		9					21
Antall strengkolonier	0					0		0					0
Totalt	15					5		11					31
Etter mediumskift													
Antall enkeltceller	0					0		0					0
Antall kolonier	8					3		9					20
Antall strengkolonier	0					0		0					0
Totalt	8					3		9					20
Antall bortfalte enkeltceller	6					2		2					10
Antall bortfalte kolonier	1					0		0					1
Antall bortfalte strengkolonier	0					0		0					0
Totalt antall bortfalte celler	7					2		2					11
Antall enkeltceller inn i bildet under mediumskift													0
Antall kolonier inn i bildet under mediumskift													0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner koloni													0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner ikke koloni													0
Antall spelelegg													0
Koloni	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	19
Strengkoloni						1	1						2
Enkeltcelle													0
Koloniens opphav													
Enkeltcelle	1	1		1		1	1	1	1	1	1		12
Enkeltcelle fra oppsplittet startdublett													0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett, oppr. En celle													0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett, oppr. To enkeltceller													0
Enkeltcelle utsendt fra koloni													0
3 generasjon enkeltcelle fra oppsplittet startdublett													0
Dublett				1	1					1			3
Triplet+			1				1	1				1	6
Enkeltcelle inn i bildet/ under mediumskift									1			1	0
Koloni som kommer inn fra mediumskift													0
Antall kolonidelinger													
Kolonien stabiliseres			1	1									2
Kolonien blir ustabil*				2									2
Koloniens stabilitet endres ikke				2									0
Celleansamling danner egen koloni			2	2									4
Celleansamlingene gror sammen, kolonien stabiliseres													0
Celleansamlingene gror sammen, kolonien blir ustabil													0
Celleansamlingene gror sammen, koloniens stabilitet endres ikke													0
Celleansamling gror sammen med annen koloni													0
Antall celler morkolonien sender ut													
Morkolonien stabiliseres							1						1
Morkolonien blir ustabil													0
Mors stabilitet endres ikke							1						1
Cellen danner egen koloni													0
Cellen danner egen strengkoloni													0
Datterkolonien gror sammen med mor, mor stabiliseres							1						1
Datterkolonien gror sammen med mor, mor blir ustabil													0
Datterkolonien gror sammen med mor, mors stabilitet endres ikke													0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien stabiliseres													0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien blir ustabil													0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, koloniens stabilitet endres ikke													0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabiliseres													0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor blir ustabil													0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabilitet endres ikke													0
Cellen finner ingen match/ deler seg ikke													0
Cellen danner vandrende kompleks													0
Cellen migrerer ut av bilde													0
Uvisst hva som skjer med cellen, filmen slutter													0
Antall ikke-familære celler kolonien tar inn													
Morkolonien stabiliseres													0
Morkolonien blir ustabil													0
Morkoloniens stabilitet endres ikke													0
Enkeltcelle, start													0
Enkeltcelle som kommer inn i bildet													0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett													0
Enkeltcelle utsendt fra koloni													0
Enkeltcelle utsendt fra strengkoloni													0
Vandrene celle/kompleks													0

29.10.07 - 05.11.07

Delforsøk	B0	B1	B2	Sum
<b>Start og sluttinfo</b>				
<b>Startinfo</b>				
Antall enkeltceller	11	9	7	27
Antall dubletter	2	2	3	7
Antall tripletter+	0	1	0	1
Totalt antall startgrupper	13	12	10	35
<b>Sluttinfo</b>				
Antall enkeltceller	0	0	0	0
Antall kolonier	11	13	8	32
Antall strengkolonier	0	0	0	0
Totalt antall sluttgrupper	11	13	8	32
<b>Mediumskift</b>				
<b>Før mediumskift</b>				
Antall enkeltceller	1	2	2	5
Antall kolonier	12	11	8	31
Antall strengkolonier	0	0	0	0
Totalt	13	13	10	36
<b>Etter mediumskift</b>				
Antall enkeltceller	0	2	1	3
Antall kolonier	12	11	8	31
Antall strengkolonier	0	0	0	0
Totalt	12	13	9	34
Antall bortfalte enkeltceller	1	0	1	2
Antall bortfalte kolonier	0	0	0	0
Antall bortfalte strengkolonier	0	0	0	0
Totalt antall bortfalte celler	1	0	1	2
Antall enkeltceller in i bildet under mediumskift				0
Antall kolonier inn i bildet under mediumskift				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner koloni				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner ikke koloni				0
Antall spellegg	1		1	2
<b>Koloni</b>	1 1 1 1 1 1 1 1 2	1 2 1 1 1 1 1 2 1 1	1 1 1 1 1 1 1 1 1	32
<b>Strengkoloni</b>				0
<b>Enkeltcelle</b>				0
<b>Koloniens opphav</b>				
Enkeltcelle	1 1 1 1 1 1 2	1 1 1 2 2 1 1 1	1 1 1 1 1 1 1	23
Enkeltcelle fra oppsplittet startdublett				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett, oppr. En celle	2	2	2	6
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett, oppr. To enkeltceller				0
Enkeltcelle utsendt fra koloni (egen bolk)				0
3.generasjon enkeltcelle fra oppsplittet startdublett				0
Dublett	1 1		1 1 1	5
Triplet+		1		1
Enkeltcelle inn i bildet/ under mediumskift				0
Koloni som kommer inn fra mediumskift				0
<b>Antall kolonidelinger</b>		1		1
Kolonien stabiliseres				0
Kolonien blir ustabil*				0
Koloniens stabilitet endres ikke		2		2
Celleansamling danner egen koloni		2		2
Celleansamlingene gror sammen, kolonien stabiliseres				0
Celleansamlingene gror sammen, kolonien blir ustabil				0
Celleansamlingene gror sammen, koloniens stabilitet endres ikke				0
Celleansamling gror sammen med annen koloni				0
<b>Antall celler morkolonien sender ut</b>		1	1	2
Morkolonien stabiliseres				0
Morkolonien blir ustabil			1	0
Morkoloniens stabilitet endres ikke				1
Cellen danner egen koloni				0
Cellen danner egen strengkolonikoloni				0
Datterkolonien gror sammen med mor, mor stabiliseres			1	1
Datterkolonien gror sammen med mor, mor blir ustabil				0
Datterkolonien gror sammen med mor, mors stabilitet endres ikke				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien stabiliseres				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien blir ustabil				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, koloniens stabilitet endres ikke				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabiliseres				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor blir ustabil				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabilitet endres ikke		1		1
Cellen finner ingen match/ deler seg ikke				0
Cellen danner vandrende kompleks				0
Cellen migrerer ut av bilde				0
Uvisst hva som skjer med cellen, filmen slutter				0
<b>Antall ikke-familære celler kolonien tar inn</b>				0
Morkolonien stabiliseres				0
Morkolonien blir ustabil				0
Morkoloniens stabilitet endres ikke				0
Enkeltcelle, start				0
Enkeltcelle som kommer inn i bildet				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett				0
Enkeltcelle utsendt fra koloni				0
Enkeltcelle utsendt fra strengkoloni				0
Vandrene celle/kompleks				0

06.11.07 - 13.11.07

Delforsøk	B0												B1												B2												Sum
Start og sluttinfo																																					
Startinfo																																					
Antall enkeltceller	10												6												10												26
Antall dubletter	1												8												3												12
Antall tripletter+	0												1												1												2
Totalt antall startgrupper	11												15												14												40
Sluttinfo																																					
Antall enkeltceller	0												0												0												0
Antall kolonier (stabile kolonier)	3												12												9												24
Antall strengkolonier (ustabile kolonier)	1												0												0												1
Totalt antall sluttgrupper	4												12												9												25
Mediumskift																																					
Før mediumskift																																					
Antall enkeltceller	4												1												3												8
Antall kolonier	5												14												9												28
Antall strengkolonier	0												0												0												0
Totalt	9												15												12												36
Etter mediumskift																																					
Antall enkeltceller	0												0												2												2
Antall kolonier	5												14												9												28
Antall strengkolonier	0												0												0												0
Totalt	5												14												11												30
Antall bortfalte enkeltceller	4												1												1												6
Antall bortfalte kolonier	0												0												0												0
Antall bortfalte strengkolonier	0												0												0												0
Totalt antall bortfalte celler	4												1												1												6
Antall enkeltceller in i bildet under mediumskift																											0										
Antall kolonier inn i bildet under mediumskift																											0										
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner koloni																											0										
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner ikke koloni																											0										
Antall speilegg																											2	2									
Koloni	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	24											
Strengkoloni	1																																				1
Enkeltcelle																																					0
Koloniens opphav																																					
Enkeltcelle	1	1	2	2	1				1		1	1		1	1	1	3		1		1					18											
Enkeltcelle fra oppsplittet startdublett																																					0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett, oppr. En celle																																					0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett, oppr. To enkeltceller																																					0
Enkeltcelle utsendt fra koloni (egen bolk)																																					0
3 generasjon enkeltcelle fra oppsplittet startdublett																																					0
Dublett													1	1	2		1			1	1		1		1		1		1		11						
Triplet+													1												1												2
Enkeltcelle inn i bildet/ under mediumskift																									1												0
Koloni som kommer inn fra mediumskift																																					0
Antall kolonidelinger																											0										
Kolonien stabiliseres																																					0
Kolonien blir ustabil*																																					0
Koloniens stabilitet endres ikke																																					0
Celleansamling danner egen koloni																											0										
Celleansamlingene gror sammen, kolonien stabiliseres																											0										
Celleansamlingene gror sammen, kolonien blir ustabil																											0										
Celleansamlingene gror sammen, koloniens stabilitet endres ikke																											0										
Celleansamling gror sammen med annen koloni																											0										
Antall celler morkolonien sender ut																											1										
Morkolonien stabiliseres																																					0
Morkolonien blir ustabil																																					0
Morkoloniens stabilitet endres ikke													1																								1
Cellen danner egen koloni																											0										
Cellen danner egen strengkolonikoloni																											0										
Datterkolonien gror sammen med mor, mor stabiliseres																											0										
Datterkolonien gror sammen med mor, mor blir ustabil																											0										
Datterkolonien gror sammen med mor, mors stabilitet endres ikke																											1										
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien stabiliseres																											0										
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien blir ustabil																											0										
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, koloniens stabilitet endres ikke																											0										
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabiliseres																											0										
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor blir ustabil																											0										
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabilitet endres ikke																											0										
Cellen finner ingen match/ deler seg ikke																											0										
Cellen danner vandrende kompleks																											0										
Cellen migrerer ut av bilde																											0										
Uvisst hva som skjer med cellen, filmen slutter																											0										
Antall ikke-familære celler kolonien tar inn																											0										
Morkolonien stabiliseres																																					0
Morkolonien blir ustabil																																					0
Morkoloniens stabilitet endres ikke																																					0
Enkeltcelle, start																											0										
Enkeltcelle som kommer inn i bildet																											0										
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett																											0										
Enkeltcelle utsendt fra koloni																											0										
Enkeltcelle utsendt fra strengkoloni																											0										
Vandrene celle/kompleks																											0										

01.10.07 - 08.10.07

Delforsøk	B0																B1																B2																Sum		
Start og sluttinfo																																																			
Startinfo																																																			
Antall enkeltceller	8																14																8																30		
Antall dubletter	0																4																1																5		
Antall tripletter+	0																0																1																1		
Totalt antall startgrupper	8																18																10																36		
Sluttinfo																																																			
Antall enkeltceller	0																0																0																0		
Antall kolonier (stabile kolonier)	7																14																7																28		
Antall strengkolonier (ustabile kolonier)	2																2																0																4		
Totalt antall sluttgrupper	9																16																7																32		
Mediumskift																																																			
Før mediumskift																																																			
Antall enkeltceller	3																6																4																13		
Antall kolonier	9																20																7																36		
Antall strengkolonier	1																4																0																5		
Totalt	13																30																11																54		
Etter mediumskift																																																			
Antall enkeltceller	4																5																3																12		
Antall kolonier	11																20																7																38		
Antall strengkolonier	0																4																0																4		
Totalt	15																29																10																54		
Antall bortfalte enkeltceller	-1																1																1																1		
Antall bortfalte kolonier	-2																0																0																-2		
Antall bortfalte strengkolonier	1																0																0																1		
Totalt antall bortfalte celler	-2																1																1																0		
Antall enkeltceller in i bildet under mediumskift																																																			
Antall kolonier inn i bildet under mediumskift																																																			
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner koloni																																																			
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner ikke koloni																																																			
Antall speilegg																																																			
Koloni																																																			
Strengkoloni																																																			
Enkeltcelle																																																			
Kolonien opphav																																																			
Enkeltcelle																																																			
Enkeltcelle fra oppsplittet startdublett																																																			
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett, oppr. En celle																																																			
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett, oppr. To enkeltceller																																																			
Enkeltcelle utsendt fra koloni																																																			
3. generasjon enkeltcelle																																																			
Dublett																																																			
Triplet+																																																			
Enkeltcelle inn under mediumskift																																																			
Koloni som kommer inn fra mediumskift																																																			
Antall kolonidelinger																																																			
Kolonien stabiliseres																																																			
Kolonien blir ustabil																																																			
Kolonien stabilitet endres ikke																																																			
Celleansamling danner egen koloni																																																			
Celleansamlingene gror sammen, kolonien stabiliseres																																																			
Celleansamlingene gror sammen, kolonien blir ustabil																																																			
Celleansamlingene gror sammen, koloniens stabilitet endres ikke																																																			
Celleansamling gror sammen med annen koloni																																																			
Antall celler morkolonien sender ut																																																			
Morkolonien stabiliseres																																																			
Morkolonien blir ustabil																																																			
Morkolonien stabilitet endres ikke																																																			
Cellen danner egen koloni																																																			
Cellen danner egen strengkoloni																																																			
Datterkolonien gror sammen med mor, mor stabiliseres																																																			
Datterkolonien gror sammen med mor, mor blir ustabil																																																			
Datterkolonien gror sammen med mor, mors stabilitet endres ikke																																																			
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien stabiliseres																																																			
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien blir ustabil																																																			
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, koloniens stabilitet endres ikke																																																			
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabiliseres																																																			
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor blir ustabil																																																			
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabilitet endres ikke																																																			
Cellen finner ingen match/ deler seg ikke																																																			
Cellen danner vandrende kompleks																																																			
Cellen migrerer ut av bilde																																																			
Uvisst hva som skjer med cellen, filmen slutter																																																			
Antall ikke-familære celler kolonien tar inn																																																			
Morkolonien stabiliseres																																																			
Morkolonien blir ustabil																																																			
Morkolonien stabilitet endres ikke																																																			
Enkeltcelle, start																																																			
Enkeltcelle som kommer inn i bildet																																																			
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett																																																			
Enkeltcelle utsendt fra koloni																																																			
Enkeltcelle utsendt fra strengkoloni																																																			
Vandrende celle/kompleks																																																			

01.10.07 - 08.10.07

Delforsøk	B3	B4	B5	Sum
<b>Start og sluttinfo</b>				
<b>Startinfo</b>				
Antall enkeltceller	14	12	11	37
Antall dubletter	0	6	4	10
Antall tripletter+	2	0	1	3
Totalt antall startgrupper	16	18	16	50
<b>Sluttinfo</b>				
Antall enkeltceller	0	1	1	2
Antall kolonier (stabile kolonier)	13	14	14	41
Antall strengkolonier (ustabile kolonier)	0	0	0	0
Totalt antall sluttgrupper	13	15	15	43
<b>Mediumskift</b>				
Før mediumskift				
Antall enkeltceller	5	5	5	15
Antall kolonier	16	15	13	44
Antall strengkolonier	0	1	1	2
Totalt	21	21	19	61
Etter mediumskift				
Antall enkeltceller	2	1	3	6
Antall kolonier	16	15	13	44
Antall strengkolonier	0	1	1	2
Totalt	18	17	17	52
Antall bortfalte enkeltceller	3	4	2	9
Antall bortfalte kolonier	0	0	0	0
Antall bortfalte strengkolonier	0	0	0	0
Totalt antall bortfalte celler	3	4	2	9
Antall enkeltceller in i bildet under mediumskift				0
Antall kolonier inn i bildet under mediumskift				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner koloni				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner ikke koloni				0
Antall speilegg	1			1
<b>Koloni</b>	1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 1	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 1 1 1	41
<b>Strengkoloni</b>				0
<b>Enkeltcelle</b>		1	1	2
<b>Kolonis opphav</b>				
Enkeltcelle	1 2 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1 2 1	1 1 1 1 1 1 1 1	24
Enkeltcelle fra oppsplittet startdublett				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett, oppr. En celle	1 1			2
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett, oppr. To enkeltceller		1 1	2	6
Enkeltcelle utsendt fra koloni				0
3. generasjon enkeltcelle	1 1			2
Dublett				0
Triplet+		1 1 1 1	1 1 1 1	9
Enkeltcelle inn under mediumskift	1			3
Koloni som kommer inn fra mediumskift	1			0
<b>Antall kolonidelinger</b>				
Kolonien stabiliseres			1	2
Kolonien blir ustabil			1	1
Kolonis stabilitet endres ikke			1	1
Celleansamling danner egen koloni			2	2
Celleansamlingene gror sammen, kolonien stabiliseres				0
Celleansamlingene gror sammen, kolonien blir ustabil				0
Celleansamlingene gror sammen, kolonis stabilitet endres ikke				2
Celleansamling gror sammen med annen koloni				0
<b>Antall celler morkolonien sender ut</b>	2	1 1	1	5
Morkolonien stabiliseres	1	1 1		3
Morkolonien blir ustabil	1			1
Morkolonis stabilitet endres ikke			1	1
Cellen danner egen koloni	1			1
Cellen danner egen strengkoloni				0
Datterkolonien gror sammen med mor, mor stabiliseres		1		1
Datterkolonien gror sammen med mor, mor blir ustabil				0
Datterkolonien gror sammen med mor, mors stabilitet endres ikke				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien stabiliseres				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien blir ustabil				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonis stabilitet endres ikke	1			1
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabiliseres				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor blir ustabil			1	1
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabilitet endres ikke				1
Cellen finner ingen match/ deler seg ikke		1		1
Cellen danner vandrende kompleks				0
Cellen migrerer ut av bilde				0
Uvisst hva som skjer med cellen, filmen slutter				0
<b>Antall ikke-familære celler kolonien tar inn</b>				0
Morkolonien stabiliseres				0
Morkolonien blir ustabil				0
Morkolonis stabilitet endres ikke				0
Enkeltcelle, start				0
Enkeltcelle som kommer inn i bildet				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett				0
Enkeltcelle utsendt fra koloni				0
Enkeltcelle utsendt fra strengkoloni				0
Vandrende celle/kompleks				0

# T-47D-P, ingen effektbestråling

22.01.07 - 29.01.07

Delforsøk	B0	B1	B2	Sum
<b>Start og sluttinfo</b>				
<b>Startinfo</b>				
Antall enkeltceller	8	5	4	17
Antall dubletter	4	1	1	6
Antall tripletter+	0	0	0	0
Totalt antall startgrupper	12	6	5	23
<b>Sluttinfo</b>				
Antall enkeltceller	0	0	2	2
Antall kolonier	10	5	4	19
Antall strenkolonier	1	1	0	2
Totalt antall sluttgrupper	11	6	6	23
<b>Mediumskift</b>				
Før mediumskift				
Antall enkeltceller	1	1	3	5
Antall kolonier	8	4	4	16
Antall strenkolonier	2	1	0	3
Totalt	11	6	7	24
Etter mediumskift				
Antall enkeltceller	1	0	3	4
Antall kolonier	8	4	4	16
Antall strenkolonier	2	1	0	3
Totalt	11	5	7	23
Antall bortfalte enkeltceller	0	1	0	1
Antall bortfalte kolonier	0	0	0	0
Antall bortfalte strenkolonier	0	0	0	0
Totalt antall bortfalte celler	0	1	0	1
Antall enkeltceller in i bildet under mediumskift				0
Antall kolonier inn i bildet under mediumskift				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner koloni				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner ikke koloni				0
Antall speileqq				0
<b>Koloni</b>	1	1	1	19
<b>Strenkoloni</b>	1	1	1	2
<b>Enkeltcelle</b>			2	2
<b>Kolonisens opphav</b>				
Enkeltcelle	1	1	1	12
Enkeltcelle fra oosolittet startdublett				2
Enkeltcelle fra oosolittet dublett. oopr. En celle				6
Enkeltcelle fra oosolittet dublett. oopr. To enkeltceller	1	1		2
Enkeltcelle utsendt fra koloni				0
3. generasjon enkeltcelle				2
Dublett	2	1		5
Triplet+				0
Enkeltcelle inn under mediumskift				0
Koloni som kommer inn fra mediumskift			1	1
<b>Antall kolonidelinger</b>		1	1	2
Kolonien stabiliseres			1	1
Kolonien blir ustabil				0
Kolonisens stabilitet endres ikke		2	1	3
Celleansamling danner egen koloni		2		2
Celleansamlingene oror sammen. kolonien stabiliseres			2	2
Celleansamlingene oror sammen. kolonien blir ustabil				0
Celleansamlingene oror sammen. kolonisens stabilitet endres ikke				0
Celleansamling oror sammen med annen koloni				0
<b>Antall celler morkolonien sender ut</b>	1			1
Morkolonien stabiliseres	1			1
Morkolonien blir ustabil				0
Morkolonisens stabilitet endres ikke				0
Cellen danner egen koloni				0
Cellen danner egen strenkoloni				0
Datterkolonien oror sammen med mor. mor stabiliseres				0
Datterkolonien oror sammen med mor. mor blir ustabil				0
Datterkolonien oror sammen med mor. mors stabilitet endres ikke				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk. kolonien stabiliseres				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk. kolonien blir ustabil				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk. kolonisens stabilitet endres ikke				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor. mor stabiliseres				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor. mor blir ustabil				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor. mor stabilitet endres ikke				0
Cellen finner ingen match/ deler seq ikke				0
Cellen danner vandrende kompleks				0
Cellen migrerer ut av bilde				0
Uvisst hva som skjer med cellen. filmen slutter	1			1
<b>Antall ikke-familære celler kolonien tar inn</b>	1			1
Morkolonien stabiliseres	1			1
Morkolonien blir ustabil				0
Morkolonisens stabilitet endres ikke				0
Enkeltcelle, start				0
Enkeltcelle som kommer inn i bildet				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett				0
Enkeltcelle utsendt fra koloni				0
Enkeltcelle utsendt fra strenkoloni	1			1
Vandrende celle/kompleks				0

06.02.07 - 13.02.07

Delforsøk	K0	K1	K2	Sum
<b>Start og sluttinfo</b>				
<b>Startinfo</b>				
Antall enkeltceller	6	4	4	14
Antall dubletter	0	0	0	0
Antall tripletter+	0	1	0	1
Totalt antall startgrupper	6	5	4	15
<b>Sluttinfo</b>				
Antall enkeltceller	0	0	0	0
Antall kolonier (stabile kolonier)	2	3	1	6
Antall strenkolonier (ustabile kolonier)	2	2	3	7
Totalt antall sluttgrupper	4	5	4	13
<b>Mediumskift</b>				
Før mediumskift				
Antall enkeltceller	3	2	0	5
Antall kolonier	5	4	3	12
Antall strenkolonier	0	1	1	2
Totalt	8	7	4	19
Etter mediumskift				
Antall enkeltceller	1	4	0	5
Antall kolonier	4	2	3	9
Antall strenkolonier	0	1	1	2
Totalt	5	7	4	16
Antall bortfalte enkeltceller	2	-2	0	0
Antall bortfalte kolonier	1	2	0	3
Antall bortfalte strenkolonier	0	0	0	0
Totalt antall bortfalte celler	3	0	0	3
Antall enkeltceller in i bildet under mediumskift				0
Antall kolonier inn i bildet under mediumskift				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner koloni				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner ikke koloni				0
Antall speilegg				0
<b>Koloni</b>	1	1	1	6
<b>Strenkoloni</b>	1	1	1	7
<b>Enkeltcelle</b>	1	1	1	0
<b>Kolonien opphav</b>				
Enkeltcelle	1	1	1	10
Enkeltcelle fra oppsplittet startdublett				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett. oopr. En celle	3	1		4
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett. oopr. To enkeltceller				0
Enkeltcelle utsendt fra koloni				0
3. generasjon enkeltcelle				0
Dublett				0
Triplet+		1		1
Enkeltcelle inn under mediumskift				0
Koloni som kommer inn fra mediumskift				0
<b>Antall kolonidelinger</b>			1	1
Kolonien stabiliseres				0
Kolonien blir ustabil				0
Kolonien stabilitet endres ikke			2	2
Celleansamling danner egen koloni				0
Celleansamlingene oror sammen. kolonien stabiliseres				0
Celleansamlingene oror sammen. kolonien blir ustabil				0
Celleansamlingene oror sammen. koloniens stabilitet endres ikke			2	2
Celleansamling oror sammen med annen koloni				0
<b>Antall celler morkolonien sender ut</b>	2	3	1	6
Morkolonien stabiliseres		1	1	2
Morkolonien blir ustabil				0
Morkolonien stabilitet endres ikke	1	2		3
Cellen danner egen koloni				0
Cellen danner egen strenkoloni				0
Datterkolonien oror sammen med mor. mor stabiliseres	1	1		2
Datterkolonien oror sammen med mor. mor blir ustabil			1	1
Datterkolonien oror sammen med mor. mors stabilitet endres ikke		1		1
Cellen finner koloni ved 1. forsøk. kolonien stabiliseres				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk. kolonien blir ustabil				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk. koloniens stabilitet endres ikke				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor. mor stabiliseres				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor. mor blir ustabil				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor. mor stabilitet endres ikke	1	1		2
Cellen finner ingen match/ deler seg ikke				0
Cellen danner vandrende kompleks				0
Cellen migrerer ut av bilde				0
Uvisst hva som skjer med cellen, filmen slutter				0
<b>Antall ikke-familære celler kolonien tar inn</b>				0
Morkolonien stabiliseres				0
Morkolonien blir ustabil				0
Morkolonien stabilitet endres ikke				0
Enkeltcelle, start				0
Enkeltcelle som kommer inn i bildet				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett				0
Enkeltcelle utsendt fra koloni				0
Enkeltcelle utsendt fra strenkoloni				0
Vandrende celler/kompleks				0

19.03.07 - 26.03.07

Delforsøk	P0								P2								Sum
<b>Start og sluttinfo</b>																	
<b>Startinfo</b>																	
Antall enkeltceller	9								9								18
Antall dubletter	2								0								2
Antall tripletter+	0								0								0
Totalt antall startgrupper	11								9								20
<b>Sluttinfo</b>																	
Antall enkeltceller	1								0								1
Antall kolonier (stabile kolonier)	8								10								18
Antall strenqkolonier (ustabile kolonier)	2								0								2
Totalt antall sluttgrupper	11								10								21
<b>Mediumskift</b>																	
Før mediumskift																	
Antall enkeltceller	2								0								2
Antall kolonier	9								10								19
Antall strenqkolonier	0								0								0
Totalt	11								10								21
Etter mediumskift																	
Antall enkeltceller	0								0								0
Antall kolonier	9								9								18
Antall strenqkolonier	0								0								0
Totalt	9								9								18
Antall bortfalte enkeltceller	2								0								2
Antall bortfalte kolonier	0								1								1
Antall bortfalte strenqkolonier	0								0								0
Totalt antall bortfalte celler	2								1								3
Antall enkeltceller in i bildet under mediumskift																	0
Antall kolonier inn i bildet under mediumskift																	0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner koloni																	0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner ikke koloni																	0
Antall speilegg									1								1
<b>Koloni</b>	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	18
<b>Strenqkoloni</b>			1			1											2
<b>Enkeltcelle</b>				1													1
<b>Kolonien opphav</b>	1		1	1	1	1		1	1	1		1	1	1	1	2	15
Enkeltcelle																	0
Enkeltcelle fra oppsplittet startdublett																	0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett. oopr. En celle										1	1						2
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett. oopr. To enkeltceller																	0
Enkeltcelle utsendt fra koloni																	0
3.ønerasjon enkeltcelle fra oppsplittet startdublett																	0
Dublett			1					1									2
Triplet+																	0
Enkeltcelle inn i bildet/ under mediumskift																	0
Koloni som kommer inn fra mediumskift																	0
<b>Antall kolonidelinaer</b>	1				1									1			3
Kolonien stabiliseres																	0
Kolonien blir ustabil																	0
Kolonienes stabilitet endres ikke	2				2									2			6
Celleansamling danner egen koloni	2				2									2			6
Celleansamlingene oror sammen. kolonien stabiliseres																	0
Celleansamlingene oror sammen. kolonien blir ustabil																	0
Celleansamlingene oror sammen. koloniens stabilitet endres ikke																	0
Celleansamling oror sammen med annen koloni																	0
<b>Antall celler morkolonien sender ut</b>																	0
Morkolonien stabiliseres																	0
Morkolonien blir ustabil																	0
Morkoloniens stabilitet endres ikke																	0
Cellen danner egen koloni																	0
Cellen danner egen strenqkoloni																	0
Datterkolonien oror sammen med mor. mor stabiliseres																	0
Datterkolonien oror sammen med mor. mor blir ustabil																	0
Datterkolonien oror sammen med mor. mors stabilitet endres ikke																	0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk. kolonien stabiliseres																	0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk. kolonien blir ustabil																	0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk. koloniens stabilitet endres ikke																	0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor. mor stabiliseres																	0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor. mor blir ustabil																	0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor. mor stabilitet endres ikke																	0
Cellen finner ingen match/ deler seg ikke																	0
Cellen danner vandrende kompleks																	0
Cellen migrerer ut av bilde																	0
Uvisst hva som skjer med cellen, filmen slutter																	0
<b>Antall ikke-familære celler kolonien tar inn</b>																	0
Morkolonien stabiliseres																	0
Morkolonien blir ustabil																	0
Morkoloniens stabilitet endres ikke																	0
Enkeltcelle. start																	0
Enkeltcelle som kommer inn i bildet																	0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett																	0
Enkeltcelle utsendt fra koloni																	0
Enkeltcelle utsendt fra strenqkoloni																	0
Vandrene celle/kompleks																	0



26.03.07 - 02.04.07

Delforsøk	P0	P1	P2	Sum
<b>Start og sluttinfo</b>				
<b>Startinfo</b>				
Antall enkeltceller	4	7	8	19
Antall dubletter	1	2	3	6
Antall tripletter+	1	0	2	3
Totalt antall startgrupper	6	9	13	28
<b>Sluttinfo</b>				
Antall enkeltceller	0	0	0	0
Antall kolonier (stabile kolonier)	5	10	8	23
Antall strenkolonier (ustabile kolonier)	0	0	0	0
Totalt antall sluttgrupper	5	10	8	23
<b>Mediumskift</b>				
<b>Før mediumskift</b>				
Antall enkeltceller	1	0	3	4
Antall kolonier	5	9	8	22
Antall strenkolonier	0	1	1	2
Totalt	6	10	12	28
<b>Etter mediumskift</b>				
Antall enkeltceller	0	0	2	2
Antall kolonier	5	8	8	21
Antall strenkolonier	0	1	1	2
Totalt	5	9	11	25
Antall bortfalte enkeltceller	1	0	1	2
Antall bortfalte kolonier	0	1	0	1
Antall bortfalte strenkolonier	0	0	0	0
Totalt antall bortfalte celler	1	1	1	3
Antall enkeltceller in i bildet under mediumskift				0
Antall kolonier inn i bildet under mediumskift				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner koloni			1	0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner ikke koloni				1
Antall speilegg				0
<b>Koloni</b>	1 1 1 1 1	2 1 1 1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1 1 1 1	23
<b>Strenkoloni</b>				0
<b>Enkeltcelle</b>				0
<b>Kolonien opphav</b>				
Enkeltcelle	1 1 1	1 1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1 1	16
Enkeltcelle fra oppsplittet startdublett				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett. ooor. En celle				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett. ooor. To enkeltceller				0
Enkeltcelle utsendt fra koloni				0
3. generasjon enkeltcelle fra oppsplittet startdublett				0
Dublett	1 1	1 1	1 1	5
Tripletter+				3
Enkeltcelle inn i bildet/ under mediumskift				0
Koloni som kommer inn fra mediumskift				0
<b>Antall kolonidelinger</b>		1		1
Kolonien stabiliseres		2		2
Kolonien blir ustabil				0
Kolonienes stabilitet endres ikke				0
Celleansamling danner egen koloni		2		2
Celleansamlingene oror sammen, kolonien stabiliseres				0
Celleansamlingene oror sammen, kolonien blir ustabil				0
Celleansamlingene oror sammen, koloniens stabilitet endres ikke				0
Celleansamling oror sammen med annen koloni				0
<b>Antall celler morkolonien sender ut</b>				0
Morkolonien stabiliseres				0
Morkolonien blir/forblir ustabil				0
Morkoloniens stabilitet endres ikke				0
Cellen danner egen koloni				0
Cellen danner egen strenkoloni				0
Datterkolonien oror sammen med mor, mor stabiliseres				0
Datterkolonien oror sammen med mor, mor blir ustabil				0
Datterkolonien oror sammen med mor, mors stabilitet endres ikke				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien stabiliseres				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien blir ustabil				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, koloniens stabilitet endres ikke				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabiliseres				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor blir ustabil				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabilitet endres ikke				0
Cellen finner ingen match/ deler seg ikke				0
Cellen danner vandrende kompleks				0
Cellen migrerer ut av bilde				0
Uvisst hva som skjer med cellen, filmen slutter				0
<b>Antall ikke-familære celler kolonien tar inn</b>			1	1
Morkolonien stabiliseres				0
Morkolonien blir ustabil				0
Morkoloniens stabilitet endres ikke			1	1
Enkeltcelle, start			1	1
Enkeltcelle som kommer inn i bildet				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett				0
Enkeltcelle utsendt fra koloni				0
Enkeltcelle utsendt fra strenkoloni				0
Vandrende celle/kompleks				0

03.09.07 - 10.09.07

Delforsøk	K0	K1	K2	Sum
<b>Start og sluttinfo</b>				
<b>Startinfo</b>				
Antall enkeltceller	11	11	8	30
Antall dubletter	1	4	1	6
Antall tripletter+	0	0	0	0
Totalt antall startgrupper	12	15	9	36
<b>Sluttinfo</b>				
Antall enkeltceller	0	1	0	1
Antall kolonier (stabile kolonier)	11	12	9	32
Antall strenkolonier (ustabile kolonier)	0	0	2	2
Totalt antall sluttgrupper	11	13	11	35
<b>Mediumskift</b>				
Før mediumskift				
Antall enkeltceller	2	3	0	5
Antall kolonier	12	12	6	30
Antall strenkolonier	1	1	4	6
Totalt	15	16	10	41
Etter mediumskift				
Antall enkeltceller	2	3	0	5
Antall kolonier	11	12	8	31
Antall strenkolonier	0	1	2	3
Totalt	13	16	10	39
Antall bortfalte enkeltceller	0	0	0	0
Antall bortfalte kolonier	1	0	-2	-1
Antall bortfalte strenkolonier	1	0	2	3
Totalt antall bortfalte celler	2	0	0	2
Antall enkeltceller in i bildet under mediumskift				0
Antall kolonier inn i bildet under mediumskift				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner koloni				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner ikke koloni				0
Antall speileqq				0
<b>Koloni</b>	1 1 1 1 1 1 2 1 1	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	1 2 1 1 1 1 1 1	32
<b>Strenkoloni</b>				2
<b>Enkeltcelle</b>		1	2	1
<b>Kolonien opphav</b>				
Enkeltcelle	1 1 2 1 1 1 1 1	2 1 1 1 1 1 1 2 1	1 1 1 1 2 1	25
Enkeltcelle fra oppsplittet startdublett				8
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett. oppr. En celle				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett. oppr. To enkeltceller				0
Enkeltcelle utsendt fra koloni				0
3. generasjon enkeltcelle	4		1 3	12
Dublett				4
Triplet+	1	1		0
Enkeltcelle inn under/utenom mediumskift				0
Koloni som kommer inn fra mediumskift				0
<b>Antall kolonidelinger</b>				
Kolonien stabiliseres	1	1 1	1 1	6
Kolonien blir ustabil		1	2 2	7
Kolonien stabilitet endres ikke	2	2		1
Celleansamling danner egen koloni	2		2 2	6
Celleansamlingene oror sammen. kolonien stabiliseres				0
Celleansamlingene oror sammen. kolonien blir ustabil				0
Celleansamlingene oror sammen. kolonien stabilitet endres ikke		2 2		6
Celleansamling oror sammen med annen koloni			2	0
<b>Antall celler morkolonien sender ut</b>	1 1		1	3
Morkolonien stabiliseres				1
Morkolonien blir ustabil				0
Morkolonien stabilitet endres ikke	1		1	2
Cellen danner egen koloni				0
Cellen danner egen strenkoloni				0
Datterkolonien oror sammen med mor. mor stabiliseres		1	1	2
Datterkolonien oror sammen med mor. mor blir ustabil				0
Datterkolonien oror sammen med mor. mors stabilitet endres ikke				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk. kolonien stabiliseres				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk. kolonien blir ustabil				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk. kolonien stabilitet endres ikke				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor. mor stabiliseres	1			1
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor. mor blir ustabil				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor. mors stabilitet endres ikke				0
Cellen finner ingen match/ deler seg ikke				0
Cellen danner vandrende kompleks				0
Cellen migrerer ut av bilde				0
Uvisst hva som skjer med cellen. filmen slutter				0
<b>Antall ikke-familære celler kolonien tar inn</b>				
Morkolonien stabiliseres				0
Morkolonien blir ustabil				0
Morkolonien stabilitet endres ikke				0
Enkeltcelle, start				0
Enkeltcelle som kommer inn i bildet				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett				0
Enkeltcelle utsendt fra koloni				0
Enkeltcelle utsendt fra strenkoloni				0
Vandrende celle/kompleks				0

10.09.07 - 17.09.07

Delforsøk	K0	K1	K2	Sum
<b>Start og sluttinfo</b>				
<b>Startinfo</b>				
Antall enkeltceller	10	10	11	31
Antall dubletter	0	3	1	4
Antall tripletter+	0	0	0	0
Totalt antall startgrupper	10	13	12	35
<b>Sluttinfo</b>				
Antall enkeltceller	0	0	0	0
Antall kolonier (stabile kolonier)	8	12	4	24
Antall strenqkolonier (ustabile kolonier)	0	2	2	4
Totalt antall sluttgrupper	8	14	6	28
<b>Mediumskift</b>				
<b>Før mediumskift</b>				
Antall enkeltceller	2	2	5	9
Antall kolonier	8	13	4	25
Antall strenqkolonier	0	1	3	4
Totalt	10	16	12	38
<b>Etter mediumskift</b>				
Antall enkeltceller	0	2	0	2
Antall kolonier	8	13	4	25
Antall strenqkolonier	0	1	3	4
Totalt	8	16	7	31
Antall bortfalte enkeltceller	2	0	5	7
Antall bortfalte kolonier	0	0	0	0
Antall bortfalte strenqkolonier	0	0	0	0
Totalt antall bortfalte celler	2	0	5	7
Antall enkeltceller in i bildet under mediumskift				0
Antall kolonier inn i bildet under mediumskift				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner koloni				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner ikke koloni				0
Antall speileqq				0
<b>Koloni</b>	1 1 1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 2 1 1 1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1	24
<b>Strenqkoloni</b>				4
<b>Enkeltcelle</b>				0
<b>Kolonien opphav</b>				0
Enkeltcelle	1 1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1 1	1 1 2 1 1 1	21
Enkeltcelle fra oppsplittet startdublett				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett. oopr. En celle	2	1 1		4
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett. oopr. To enkeltceller				0
Enkeltcelle utsendt fra koloni				0
3. oeneration enkeltcelle				0
Dublett			1 1 1	4
Triplet+				0
Enkeltcelle inn under/utenom mediumskift				0
Koloni som kommer inn fra mediumskift				0
<b>Antall kolonidelinaer</b>	1	1	1	4
Kolonien stabiliseres				0
Kolonien blir/forblir ustabil*				0
Kolonien stabilitet endres ikke	2	2	2	8
Celleansamling danner egen koloni				0
Celleansamlingene oror sammen, kolonien stabiliseres				0
Celleansamlingene oror sammen, kolonien blir ustabil				0
Celleansamlingene oror sammen, koloniens stabilitet endres ikke	2	2	2	8
Celleansamling oror sammen med annen koloni				0
<b>Antall celler morkolonien sender ut</b>		4	1	7
Morkolonien stabiliseres				0
Morkolonien blir ustabil			2	2
Morkoloniens stabilitet endres ikke		4	1	5
Cellen danner egen koloni		1		1
Cellen danner egen strenqkoloni				0
Datterkolonien oror sammen med mor, mor stabiliseres			1	1
Datterkolonien oror sammen med mor, mor blir ustabil				0
Datterkolonien oror sammen med mor, mors stabilitet endres ikke		3	1	5
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien stabiliseres				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien blir ustabil				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, koloniens stabilitet endres ikke				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabiliseres				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor blir ustabil				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabilitet endres ikke				0
Cellen finner ingen match/ deler seg ikke				0
Cellen danner vandrende kompleks				0
Cellen migrerer ut av bilde				0
Uvisst hva som skjer med cellen, filmen slutter				0
<b>Antall ikke-familære celler kolonien tar inn</b>			1	1
Morkolonien stabiliseres				0
Morkolonien blir ustabil				0
Morkoloniens stabilitet endres ikke			1	1
Enkeltcelle, start			1	1
Enkeltcelle som kommer inn i bildet				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett				0
Enkeltcelle utsendt fra koloni				0
Enkeltcelle utsendt fra strenqkoloni				0
Vandrende celle/kompleks				0

17.09.07 - 24.09.07

Delforsøk	K0					K1										K2					Sum
Start og sluttinfo																					
Startinfo																					
Antall enkeltceller	7					10										10					27
Antall dubletter	0					3										2					5
Antall tripletter+	0					0										0					0
Totalt antall startgrupper	7					13										12					32
Sluttinfo																					
Antall enkeltceller	0					0										0					0
Antall kolonier (stabile kolonier)	5					11										6					22
Antall strenkolonier (ustabile kolonier)	0					0										1					1
Totalt antall sluttgrupper	5					11										7					23
Mediumskift																					
Før mediumskift																					
Antall enkeltceller	0					1										1					2
Antall kolonier	5					12										9					26
Antall strenkolonier	0					0										0					0
Totalt	5					13										10					28
Etter mediumskift																					
Antall enkeltceller	0					1										0					1
Antall kolonier	5					12										8					25
Antall strenkolonier	0					0										0					0
Totalt	5					13										8					26
Antall bortfalte enkeltceller	0					0										1					1
Antall bortfalte kolonier	0					0										1					1
Antall bortfalte strenkolonier	0					0										0					0
Totalt antall bortfalte celler	0					0										2					2
Antall enkeltceller in i bildet under mediumskift																					
Antall kolonier inn i bildet under mediumskift																					
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner koloni																					
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner ikke koloni																					
Antall speilegg																					
Koloni	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	
Strenkoloni																				1	
Enkeltcelle																				0	
Kolonien opphav																					
Enkeltcelle	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1			1	2	2	2	2	1	1	25	
Enkeltcelle fra oppsplittet startdublett																				0	
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett. ooor. En celle												1	1							4	
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett. ooor. To enkeltceller																				0	
Enkeltcelle utsendt fra koloni																				0	
3. generasjon enkeltcelle																				0	
Dublett																				3	
Tripletter+														1						0	
Enkeltcelle inn under/utenom mediumskift																				0	
Koloni som kommer inn fra mediumskift																				0	
Antall kolonidelinger																					
Kolonien stabiliseres																				1	
Kolonien blir ustabil*																				1	
Kolonien stabiliseres endres ikke																				0	
Celleansamling danner egen koloni																				1	
Celleansamlingene oror sammen, kolonien stabiliseres																				0	
Celleansamlingene oror sammen, kolonien blir ustabil																				0	
Celleansamlingene oror sammen, kolonien stabiliseres endres ikke																				0	
Celleansamling oror sammen med annen koloni																				2	
Antall celler morkolonien sender ut																					
Morkolonien stabiliseres																				2	
Morkolonien blir ustabil																				0	
Morkolonien stabiliseres endres ikke																				0	
Cellen danner egen koloni																				2	
Cellen danner egen strenkoloni																				0	
Datterkolonien oror sammen med mor, mor stabiliseres																				0	
Datterkolonien oror sammen med mor, mor blir ustabil																				0	
Datterkolonien oror sammen med mor, mors stabilitet endres ikke																				0	
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien stabiliseres																				0	
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien blir ustabil																				0	
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien stabiliseres endres ikke																				1	
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabiliseres																				0	
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor blir ustabil																				0	
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabilitet endres ikke																				1	
Cellen finner ingen match/ deler seg ikke																				0	
Cellen danner vandrende kompleks																				0	
Cellen migrerer ut av bilde																				0	
Uvisst hva som skjer med cellen, filmen slutter																				0	
Antall ikke-familære celler kolonien tar inn																					
Morkolonien stabiliseres																				1	
Morkolonien blir ustabil																				0	
Morkolonien stabiliseres endres ikke																				0	
Enkeltcelle, start																				1	
Enkeltcelle som kommer inn i bildet																				0	
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett																				0	
Enkeltcelle utsendt fra koloni																				0	
Enkeltcelle utsendt fra strenkoloni																				1	
Vandrende celle/kompleks																				0	

# T-47D-P + 0.3 Gy

22.01.07 - 29.01.07

Delforsøk	K0	K1	K2	Sum
<b>Start og sluttinfo</b>				
<b>Startinfo</b>				
Antall enkeltceller	8	9	11	28
Antall dubletter	2	3	1	6
Antall tripletter+	0	1	0	1
Totalt antall startgrupper	10	13	12	35
<b>Sluttinfo</b>				
Antall enkeltceller	0	0	0	0
Antall kolonier	8	8	5	21
Antall strenkolonier	0	1	2	3
Totalt antall sluttgrupper	8	9	7	24
<b>Mediumskift</b>				
Før mediumskift				
Antall enkeltceller	0	2	4	6
Antall kolonier	8	8	7	23
Antall strenkolonier	0	2	1	3
Totalt	8	12	12	32
Etter mediumskift				
Antall enkeltceller	0	0	1	1
Antall kolonier	8	8	7	23
Antall strenkolonier	0	2	1	3
Totalt	8	10	9	27
Antall bortfalte enkeltceller	0	2	3	5
Antall bortfalte kolonier	0	0	0	0
Antall bortfalte strenkolonier	0	0	0	0
Totalt antall bortfalte celler	0	2	3	5
Antall enkeltceller in i bildet under mediumskift				0
Antall kolonier inn i bildet under mediumskift				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner koloni				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner ikke koloni				0
Antall speileqq		1		1
<b>Koloni</b>	1 1 1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1 1 1	21
<b>Strenkoloni</b>		1	1	3
<b>Enkeltcelle</b>				0
<b>Koloniens opphav</b>				
Enkeltcelle	1 1 1 1 2	1 1 1	1 1 1 1	16
Enkeltcelle fra oopsplittet startdublett				0
Enkeltcelle fra oopsplittet dublett. ooor. En celle	2			5
Enkeltcelle fra oopsplittet dublett. ooor. To enkeltceller		1 1		2
Enkeltcelle utsendt fra koloni				0
3. generasjon enkeltcelle				0
Dublett	1 1 1	1		4
Tripletter			1	2
Enkeltcelle inn under mediumskift				0
Koloni som kommer inn fra mediumskift				0
<b>Antall kolonidelinger</b>				0
Kolonien stabiliseres				0
Kolonien blir ustabil				0
Koloniens stabilitet endres ikke				0
Celleansamling danner egen koloni				0
Celleansamlingene aror sammen. kolonien stabiliseres				0
Celleansamlingene aror sammen. kolonien blir ustabil				0
Celleansamlingene aror sammen. koloniens stabilitet endres ikke				0
Celleansamling aror sammen med annen koloni				0
<b>Antall celler morkolonien sender ut</b>	1	1	1	4
Morkolonien stabiliseres				0
Morkolonien blir ustabil				0
Morkoloniens stabilitet endres ikke	1	1	1	4
Cellen danner egen koloni				0
Cellen danner egen strenkoloni				0
Datterkolonien aror sammen med mor. mor stabiliseres				0
Datterkolonien aror sammen med mor. mor blir ustabil				0
Datterkolonien aror sammen med mor. mors stabilitet endres ikke	1			1
Cellen finner koloni ved 1. forsøk. kolonien stabiliseres				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk. kolonien blir ustabil				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk. koloniens stabilitet endres ikke		1		1
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor. mor stabiliseres			1	1
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor. mor blir ustabil				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor. mor stabilitet endres ikke				0
Cellen finner ingen match/ deler seq ikke				0
Cellen danner vandrende kompleks		1		1
Cellen migrerer ut av bilde				0
Uvisst hva som skjer med cellen. filmen slutter				0
<b>Antall ikke-familære celler kolonien tar inn</b>		1	1	2
Morkolonien stabiliseres				0
Morkolonien blir ustabil				0
Morkoloniens stabilitet endres ikke		1	1	2
Enkeltcelle, start				0
Enkeltcelle som kommer inn i bildet				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett				0
Enkeltcelle utsendt fra koloni				0
Enkeltcelle utsendt fra strenkoloni		1		1
Vandrene celle/kompleks			1	1

06.02.07 -12.02.07

Delforsøk	B0	B1	B2	Sum
<b>Start og sluttinfo</b>				
<b>Startinfo</b>				
Antall enkeltceller	3	2	6	11
Antall dubletter	2	1	0	3
Antall tripletter+	0	0	0	0
Totalt antall startgrupper	5	3	6	14
<b>Sluttinfo</b>				
Antall enkeltceller	0	0	0	0
Antall kolonier (stabile kolonier)	4	3	3	10
Antall strenkolonier (ustabile kolonier)	1	0	2	3
Totalt antall sluttgrupper	5	3	5	13
<b>Mediumskift</b>				
Før mediumskift				
Antall enkeltceller	1	0	1	2
Antall kolonier	5	3	5	13
Antall strenkolonier	0	0	0	0
Totalt	6	3	6	15
Etter mediumskift				
Antall enkeltceller	1	0	1	2
Antall kolonier	5	3	5	13
Antall strenkolonier	0	0	0	0
Totalt	6	3	6	15
Antall bortfalte enkeltceller	0	0	0	0
Antall bortfalte kolonier	0	0	0	0
Antall bortfalte strenkolonier	0	0	0	0
Totalt antall bortfalte celler	0	0	0	0
Antall enkeltceller in i bildet under mediumskift				0
Antall kolonier inn i bildet under mediumskift				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner koloni			1	0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner ikke koloni				1
Antall speileqq				0
<b>Koloni</b>	1	1	1	10
<b>Strenkoloni</b>	1	1	1	3
<b>Enkeltcelle</b>				0
<b>Koloniens opphav</b>				
Enkeltcelle	1	1	1	10
Enkeltcelle fra oppsplittet startdublett				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett. oppr. En celle				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett. oppr. To enkeltceller				0
Enkeltcelle utsendt fra koloni				0
3. generasjon enkeltcelle				0
Dublett	1	1	1	3
Triplet+				0
Enkeltcelle inn under mediumskift				0
Koloni som kommer inn fra mediumskift				0
<b>Antall kolonidelinger</b>	1	1		2
Kolonien stabiliseres				0
Kolonien blir ustabil				0
Koloniens stabilitet endres ikke	2	2		4
Celleansamling danner egen koloni				0
Celleansamlingene aror sammen. kolonien stabiliseres				0
Celleansamlingene aror sammen. kolonien blir ustabil				0
Celleansamlingene aror sammen. koloniens stabilitet endres ikke	2	2		4
Celleansamling aror sammen med annen koloni				0
<b>Antall celler morkolonien sender ut</b>	2	1		3
Morkolonien stabiliseres				0
Morkolonien blir ustabil				0
Morkoloniens stabilitet endres ikke	2	1		3
Cellen danner egen koloni				0
Cellen danner egen strenkoloni				0
Datterkolonien aror sammen med mor. mor stabiliseres				0
Datterkolonien aror sammen med mor. mor blir ustabil				0
Datterkolonien aror sammen med mor. mors stabilitet endres ikke	1			1
Cellen finner koloni ved 1. forsøk. kolonien stabiliseres				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk. kolonien blir ustabil				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk. koloniens stabilitet endres ikke				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor. mor stabiliseres				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor. mor blir ustabil				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor. mor stabilitet endres ikke	2			2
Cellen finner ingen match/ deler seq ikke				0
Cellen danner vandrende kompleks				0
Cellen migrerer ut av bilde				0
Uvisst hva som skjer med cellen. filmen slutter				0
<b>Antall ikke-familære celler kolonien tar inn</b>				0
Morkolonien stabiliseres				0
Morkolonien blir ustabil				0
Morkoloniens stabilitet endres ikke				0
Enkeltcelle. start				0
Enkeltcelle som kommer inn i bildet				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett				0
Enkeltcelle utsendt fra koloni				0
Enkeltcelle utsendt fra strenkoloni				0
Vandrene celle/kompleks				0

19.03.07 - 26.03.07

Delforsøk	P0	P1	P2	Sum
<b>Start og sluttinfo</b>				
<b>Startinfo</b>				
Antall enkeltceller	10	16	10	36
Antall dubletter	1	3	2	6
Antall tripletter+	0	0	0	0
Totalt antall startgrupper	11	19	12	42
<b>Sluttinfo</b>				
Antall enkeltceller	0	2	1	3
Antall kolonier (stabile kolonier)	9	12	12	33
Antall strengkolonier (ustabile kolonier)	1	1	0	2
Totalt antall sluttgrupper	10	15	13	38
<b>Mediumskift</b>				
<b>Før mediumskift</b>				
Antall enkeltceller	1	3	4	8
Antall kolonier	10	13	10	33
Antall strengkolonier	0	0	1	1
Totalt	11	16	15	42
<b>Etter mediumskift</b>				
Antall enkeltceller	0	2	1	3
Antall kolonier	10	12	10	32
Antall strengkolonier	0	0	1	1
Totalt	10	14	12	36
Antall bortfalte enkeltceller	1	1	3	5
Antall bortfalte kolonier	0	1	0	1
Antall bortfalte strengkolonier	0	0	0	0
Totalt antall bortfalte celler	1	2	3	6
Antall enkeltceller in i bildet under mediumskift				0
Antall kolonier inn i bildet under mediumskift				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner koloni				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner ikke koloni				0
Antall speilegg				0
<b>Koloni</b>	1 1 1 1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	1 1 2 1 1 1 1 1 1	31
<b>Strengkoloni</b>				2
<b>Enkeltcelle</b>	1	2	3	5
<b>Koloniens opphav</b>				0
Enkeltcelle	1 1 1 2 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1 1 2 1 1 1	1 1 1 1 1 1 1 1 1	30
Enkeltcelle fra oppsplittet startdublett				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett, oppr. En celle				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett, oppr. To enkeltceller				0
Enkeltcelle utsendt fra koloni				0
3.generasjon enkeltcelle fra oppsplittet startdublett				0
Dublett	1	1 1 1	1 1	7
Triplet+				0
Enkeltcelle inn i bildet/ under mediumskift				0
Koloni som kommer inn fra mediumskift				0
<b>Antall kolonidelinger</b>		1	1 1 1	4
Kolonien stabiliseres		1		1
Kolonien blir ustabil*				0
Koloniens stabilitet endres ikke		1	2 2 2	7
Celleansamling danner egen koloni			2 2	4
Celleansamlingene gror sammen, kolonien stabiliseres				0
Celleansamlingene gror sammen, kolonien blir ustabil				0
Celleansamlingene gror sammen, koloniens stabilitet endres ikke		2	2	4
Celleansamling gror sammen med annen koloni				0
<b>Antall celler morkolonien sender ut</b>	2	2 1	1 2 1	9
Morkolonien stabiliseres				0
Morkolonien blir ustabil				0
Mors stabilitet endres ikke	2	2 1	1 2 1	9
Cellen danner egen koloni				0
Cellen danner egen strengkoloni				0
Datterkolonien gror sammen med mor, mor stabiliseres		1	1	2
Datterkolonien gror sammen med mor, mor blir ustabil				0
Datterkolonien gror sammen med mor, mors stabilitet endres ikke				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien stabiliseres		1		1
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien blir ustabil				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, koloniens stabilitet endres ikke		1		1
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabiliseres				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor blir ustabil				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mors stabilitet endres ikke	1			1
Cellen finner ingen match/ deler seg ikke			1	1
Cellen danner vandrende kompleks				0
Cellen migrerer ut av bilde				0
Uvisst hva som skjer med cellen, filmen slutter	1		2 1	4
<b>Antall ikke-familære celler kolonien tar inn</b>				0
Morkolonien stabiliseres				0
Morkolonien blir ustabil				0
Morkoloniens stabilitet endres ikke				0
Enkeltcelle, start				0
Enkeltcelle som kommer inn i bildet				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett				0
Enkeltcelle utsendt fra koloni				0
Enkeltcelle utsendt fra strengkoloni				0
Vandrende celle/kompleks				0

03.09.07 - 10.09.07

Delforsøk	B0	B1	B2	Sum
<b>Start og sluttinfo</b>				
<b>Startinfo</b>				
Antall enkeltceller	10	8	13	31
Antall dubletter	3	4	1	8
Antall tripletter+	0	0	0	0
Totalt antall startgrupper	13	12	14	39
<b>Sluttinfo</b>				
Antall enkeltceller	0	1	1	2
Antall kolonier (stabile kolonier)	13	7	12	32
Antall strengkolonier (ustabile kolonier)	1	3	0	4
Totalt antall sluttgrupper	14	11	13	38
<b>Mediumskift</b>				
<b>Før mediumskift</b>				
Antall enkeltceller	3	1	3	7
Antall kolonier	13	10	11	34
Antall strengkolonier	1	0	1	2
Totalt	17	11	15	43
<b>Etter mediumskift</b>				
Antall enkeltceller	2	1	1	4
Antall kolonier	12	10	11	33
Antall strengkolonier	1	0	1	2
Totalt	15	11	13	39
Antall bortfalte enkeltceller	1	0	2	3
Antall bortfalte kolonier	1	0	0	1
Antall bortfalte strengkolonier	0	0	0	0
Totalt antall bortfalte celler	2	0	2	4
Antall enkeltceller in i bildet under mediumskift				0
Antall kolonier inn i bildet under mediumskift				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner koloni				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner ikke koloni		1		1
Antall speilegg				0
<b>Koloni</b>	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1 1 1	1 2 1 1 1 1 1 1 1 1	31
<b>Strengkoloni</b>	1	1 1		4
<b>Enkeltcelle</b>		1	1	2
<b>Koloniens opphav</b>				
Enkeltcelle	1	1 2 1 1	1 1 1 1 2 1 1	27
Enkeltcelle fra oppsplittet startdublett				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett, oppr. En celle			1 1	2
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett, oppr. To enkeltceller				0
Enkeltcelle utsendt fra koloni				0
3. generasjon enkeltcelle	4		4	8
Dublett	1	1 1 1 1		8
Triplette				0
Enkeltcelle inn under/utenom mediumskift				0
Koloni som kommer inn fra mediumskift				0
<b>Antall kolonidelinger</b>	1		1	2
Kolonien stabiliseres	1		2	3
Kolonien blir ustabil				0
Koloniens stabilitet endres ikke	1			1
Celleansamling danner egen koloni	1		2	3
Celleansamlingene gror sammen, kolonien stabiliseres				0
Celleansamlingene gror sammen, kolonien blir ustabil				0
Celleansamlingene gror sammen, koloniens stabilitet endres ikke				0
Celleansamling gror sammen med annen koloni	1			1
<b>Antall celler morkolonien sender ut</b>	2	3	1	7
Morkolonien stabiliseres			1	1
Morkolonien blir ustabil				0
Morkoloniens stabilitet endres ikke	2	3	1	6
Cellen danner egen koloni	1			1
Cellen danner egen strengkoloni				0
Datterkolonien gror sammen med mor, mor stabiliseres	1		1	2
Datterkolonien gror sammen med mor, mor blir ustabil		2		2
Datterkolonien gror sammen med mor, mors stabilitet endres ikke			1	1
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien stabiliseres				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien blir ustabil				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, koloniens stabilitet endres ikke				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabiliseres				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor blir ustabil				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabilitet endres ikke	1			1
Cellen finner ingen match/ deler seg ikke				0
Cellen danner vandrende kompleks				0
Cellen migrerer ut av bilde				0
Uvisst hva som skjer med cellen, filmen slutter				0
<b>Antall ikke-familære celler kolonien tar inn</b>				0
Morkolonien stabiliseres				0
Morkolonien blir ustabil				0
Morkoloniens stabilitet endres ikke				0
Enkeltcelle, start				0
Enkeltcelle som kommer inn i bildet				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett				0
Enkeltcelle utsendt fra koloni				0
Enkeltcelle utsendt fra strengkoloni				0
Vandrende celle/kompleks				0



10.09.07 -17.09.07

[illegible]

17.09.07 - 24.09.07

Delforsøk	B0	B1	B2	Sum
<b>Start og sluttinfo</b>				
<b>Startinfo</b>				
Antall enkeltceller	8	11	15	34
Antall dubletter	2	4	0	6
Antall tripletter+	0	0	0	0
Totalt antall startgrupper	10	15	15	40
<b>Sluttinfo</b>				
Antall enkeltceller	0	0	0	0
Antall kolonier (stabile kolonier)	10	12	15	37
Antall strengkolonier (ustabile kolonier)	0	2	0	2
Totalt antall sluttgrupper	10	14	15	39
<b>Mediumskift</b>				
Før mediumskift				
Antall enkeltceller	1	2	2	5
Antall kolonier	9	11	15	35
Antall strengkolonier	0	2	0	2
Totalt	10	15	17	42
Etter mediumskift				
Antall enkeltceller	0	1	0	1
Antall kolonier	9	11	15	35
Antall strengkolonier	0	2	0	2
Totalt	9	14	15	38
Antall bortfalte enkeltceller	1	1	2	4
Antall bortfalte kolonier	0	0	0	0
Antall bortfalte strengkolonier	0	0	0	0
Totalt antall bortfalte celler	1	1	2	4
Antall enkeltceller in i bildet under mediumskift				0
Antall kolonier inn i bildet under mediumskift				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner koloni				0
Enkeltcelle som danner vandrende kompleks. Finner ikke koloni				0
Antall speilegg				0
<b>Koloni</b>	1 1 1 1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1 1 1 2 1	2 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	36
<b>Strengkoloni</b>		1	1	2
<b>Enkeltcelle</b>				0
<b>Kolonis opphav</b>				
Enkeltcelle	1 1 1 1 1 1 1	1 1 1 2 1 1 1 1	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	29
Enkeltcelle fra oppsplittet startdublett				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett, oppr. En celle			2 2	4
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett, oppr. To enkeltceller				0
Enkeltcelle utsendt fra koloni				0
3. generasjon enkeltcelle				0
Dublett	1 1	1 1 1		6
Triplet+				0
Enkeltcelle inn under/utenom mediumskift				0
Koloni som kommer inn fra mediumskift				0
<b>Antall kolonidelinger</b>	1 1	1	1 1	6
Kolonien stabiliseres		2	2	4
Kolonien blir ustabil*				0
Kolonis stabilitet endres ikke	2 2		2	8
Celleansamling danner egen koloni			2	2
Celleansamlingene gror sammen, kolonien stabiliseres				0
Celleansamlingene gror sammen, kolonien blir ustabil				0
Celleansamlingene gror sammen, kolonis stabilitet endres ikke	2 2		2	6
Celleansamling gror sammen med annen koloni		2	2	4
<b>Antall celler morkolonien sender ut</b>		1	1	3
Morkolonien stabiliseres				0
Morkolonien blir ustabil				0
Morkolonis stabilitet endres ikke		1	1	3
Cellen danner egen koloni				0
Cellen danner egen strengkoloni			1	1
Datterkolonien gror sammen med mor, mor stabiliseres				0
Datterkolonien gror sammen med mor, mor blir ustabil				0
Datterkolonien gror sammen med mor, mors stabilitet endres ikke		1		1
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien stabiliseres				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien blir ustabil				0
Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonis stabilitet endres ikke				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabiliseres				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor blir ustabil				0
Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabilitet endres ikke			1	1
Cellen finner ingen match/ deler seg ikke				0
Cellen danner vandrende kompleks				0
Cellen migrerer ut av bilde				0
Uvisst hva som skjer med cellen, filmen slutter				0
<b>Antall ikke-familære celler kolonien tar inn</b>				0
Morkolonien stabiliseres				0
Morkolonien blir ustabil				0
Morkolonis stabilitet endres ikke				0
Enkeltcelle, start				0
Enkeltcelle som kommer inn i bildet				0
Enkeltcelle fra oppsplittet dublett				0
Enkeltcelle utsendt fra koloni				0
Enkeltcelle utsendt fra strengkoloni				0
Vandrende celle/kompleks				0

## II “Plating Efficiency”

På bakgrunn av informasjonen i observasjonsskjemaene ble ”plating efficiency” beregnet for T-47D- og T-47D-P-cellene, med og uten effektbestråling. Beregningene ble gjort per bildesnitt og per celleflaske, der hver celleflaske betår av tre bildesnitt.

### Per bildesnitt

Gjennomsnittlig PE beregnes ved å ta gjennomsnittet av ”PE” i hvert bildesnitt (film)

T-47D-P	Start og sluttinfo	22.jan		06.feb		03.sep		10.sep		17.sep		19.mar		26.mar		Snitt	Stavvik								
	Startinfo																								
	Antall enkeltceller	8	9	11	6	4	4	11	11	8	10	10	11	7	10			10	9	9	4	7	8	8,4	1,9
	Antall dubletter	2	3	1	0	0	0	1	4	1	0	3	1	0	3			2	2	0	1	2	3	1,5	0,3
	Antall tripletter+	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0			0	0	0	1	0	2	0,3	0,1
Totalt antall startgrupper		10	13	12	6	5	4	12	15	9	10	13	12	7	13	12	11	9	6	9	13	10,1	2,2		
Sluttinfo																									
Antall enkeltceller	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0,1	0,0			
Antall kolonier	8	8	5	2	3	1	11	12	9	8	12	4	5	11	6	8	10	5	10	8	7,3	1,6			
Antall strengkolonier	0	1	2	2	2	3	0	0	2	0	2	2	0	0	1	2	0	0	0	0	1,0	0,2			
Totalt antall sluttgrupper		8	9	7	4	5	4	11	13	11	8	14	6	5	11	7	11	10	5	10	8	8,4	1,9		
Antall enkeltceller	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,067	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,091	0,000	0,000	0,000	0,000	0,008	0,002			
Antall kolonier	0,800	0,615	0,417	0,333	0,600	0,250	0,917	0,800	1,000	0,800	0,923	0,333	0,714	0,846	0,500	0,727	1,111	0,833	1,111	0,615	0,712	0,159			
Antall strengkolonier	0,000	0,077	0,167	0,333	0,400	0,750	0,000	0,000	0,222	0,000	0,154	0,167	0,000	0,000	0,083	0,182	0,000	0,000	0,000	0,000	0,127	0,028			
Overlevelse	0,800	0,692	0,583	0,667	1,000	1,000	0,917	0,800	1,222	0,800	1,077	0,500	0,714	0,846	0,583	0,909	1,111	0,833	1,111	0,615	0,839	0,188			
T-47D-P (0.3Gy)	Start og sluttinfo	22.jan		06.feb		03.sep		10.sep		17.sep		24.sep													
	Startinfo																								
	Antall enkeltceller	8	5	4	3	2	6	10	8	13	12	9	12	8	11	15	10	16	10		9,0	2,1			
	Antall dubletter	4	1	1	2	1	0	3	4	1	2	2	0	2	4	0	1	3	2		1,8	0,4			
	Antall tripletter+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0,0	0,0			
	Totalt antall startgrupper		12	6	5	5	3	6	13	12	14	14	11	12	10	15	15	11	19	12		10,8	2,6		
	Sluttinfo																								
	Antall enkeltceller	0	0	2	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	2	1		0,5	0,1			
	Antall kolonier	10	5	4	4	3	3	13	7	12	11	7	9	10	12	15	9	12	12		8,8	2,1			
Antall strengkolonier	1	1	0	1	0	2	1	3	0	0	3	1	0	2	0	1	1	0		0,9	0,2				
Totalt antall sluttgrupper		11	6	6	5	3	5	14	11	13	12	11	10	10	14	15	10	15	13		10,2	2,4			
Antall enkeltceller	0,000	0,000	0,400	0,000	0,000	0,000	0,000	0,083	0,071	0,071	0,091	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,105	0,083		0,050	0,012				
Antall kolonier	0,833	0,833	0,800	0,800	1,000	0,500	1,000	0,583	0,857	0,786	0,636	0,750	1,000	0,800	1,000	0,818	0,632	1,000		0,813	0,192				
Antall strengkolonier	0,083	0,167	0,000	0,200	0,000	0,333	0,077	0,250	0,000	0,000	0,273	0,083	0,000	0,133	0,000	0,091	0,053	0,000		0,097	0,023				
Overlevelse,	0,917	1,000	0,800	1,000	1,000	0,833	1,077	0,833	0,857	0,786	0,909	0,833	1,000	0,933	1,000	0,909	0,684	1,000		0,910	0,214				

T-47D	Start og sluttinfo	09.apr	16.apr					23.apr					29.okt					06.nov					19.mar					26.mar											
	Startinfo																																						
	Antall enkeltceller	5	9	8	9	11	8	8	3	13	7	9	9	4	12	9	9	10	6	7	6	14					8,4	1,8											
	Antall dubletter	2	5	5	4	3	4	1	5	3	2	2	1	2	1	2	3	3	1	1	0	3					2,5	0,6											
	Antall tripletter+	2	0	1	2	1	2	1	0	0	1	0	0	3	2	1	0	0	0	1	1	0					0,9	0,2											
	Totalt antall startgrupper	9	14	14	15	15	14	10	8	16	10	11	10	9	15	12	12	13	7	9	7	17					11,8	2,6											
	Sluttinfo																																						
	Antall enkeltceller	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1					0,3	0,1											
	Antall kolonier	7	10	10	16	12	13	10	8	11	8	9	10	6	9	10	9	7	7	6	5	10					9,2	2,0											
	Antall strengkolonier	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0	2	2	0					0,6	0,1											
	Totalt antall sluttgrupper	8	13	11	16	13	14	10	8	11	8	9	11	6	9	10	11	10	7	8	7	11					10,0	2,2											
	Antall enkeltceller	0,000	0,071	0,000	0,000	0,067	0,071	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,100	0,000	0,000	0,000	0,083	0,000	0,000	0,000	0,000	0,059					0,022	0,005											
	Antall kolonier	0,778	0,714	0,714	1,067	0,800	0,929	1,000	1,000	0,688	0,800	0,818	1,000	0,667	0,600	0,833	0,750	0,538	1,000	0,667	0,714	0,588					0,794	0,173											
	Antall strengkolonier	0,111	0,143	0,071	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,083	0,231	0,000	0,222	0,286	0,000					0,055	0,012											
	Overlevelse	0,889	0,857	0,786	1,067	0,800	0,929	1,000	1,000	0,688	0,800	0,818	1,000	0,667	0,600	0,833	0,833	0,769	1,000	0,889	1,000	0,588					0,848	0,185											
T-47D	Start og sluttinfo	09.apr	16.apr					23.apr					29.okt					06.nov					24.sep					01.okt					01.okt						
(0.3Gy)	Startinfo																																						
	Antall enkeltceller	6	5	4	11	11	11	14	9	4	11	9	7	10	6	10	12	3	8	8	14	8	14	12	11	9,1	1,9												
	Antall dubletter	4	4	6	3	1	5	1	5	1	2	2	3	1	8	3	2	0	1	0	4	1	0	6	4	2,8	0,6												
	Antall tripletter+	2	0	1	2	2	1	0	0	2	0	1	0	0	1	1	1	2	3	0	0	1	2	0	1	1,0	0,2												
	Totalt antall startgrupper	12	9	11	16	14	17	15	14	7	13	12	10	11	15	14	15	5	12	8	18	10	16	18	16	12,8	2,6												
	Sluttinfo																																						
	Antall enkeltceller	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0,1	0,0												
	Antall kolonier	10	6	10	14	9	15	7	10	10	11	13	8	3	12	9	8	2	9	7	14	7	12	14	14	9,8	2,0												
	Antall strengkolonier	0	2	0	0	3	1	3	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	2	2	0	0	0	0	0,7	0,1												
	Totalt antall sluttgrupper	10	8	10	14	12	16	10	11	10	11	13	8	4	12	9	9	3	9	9	16	7	12	15	15	10,5	2,2												
	Antall enkeltceller	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,071	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,056	0,063	0,008	0,002													
	Antall kolonier	0,833	0,667	0,909	0,875	0,643	0,882	0,467	0,714	1,429	0,846	1,083	0,800	0,273	0,800	0,643	0,533	0,400	0,750	0,875	0,778	0,700	0,750	0,778	0,875	0,763	0,156												
	Antall strengkolonier	0,000	0,222	0,000	0,000	0,214	0,059	0,200	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,091	0,000	0,000	0,067	0,200	0,000	0,250	0,111	0,000	0,000	0,000	0,000	0,059	0,012												
	Overlevelse,	0,833	0,889	0,909	0,875	0,857	0,941	0,667	0,714	1,429	0,846	1,083	0,800	0,364	0,800	0,643	0,600	0,600	0,750	1,125	0,889	0,700	0,750	0,778	0,875	0,822	0,168												
	Overlevelse, korrigert for mult.	M=	1,366																									0,753	0,206										

## Per celleflaske, der hver celleflaske består av tre bildesnitt

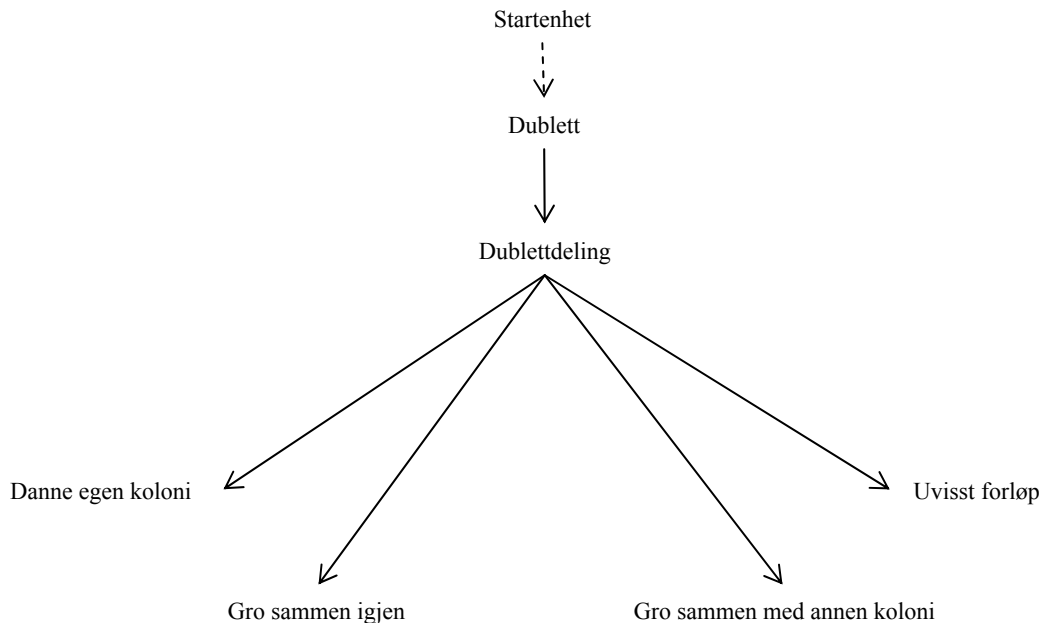
T-47D-P	Start og sluttinfo	22.jan	06.feb	03.sep	10.sep	17.sep	19.mar	26.mar		Snitt	St.avvik
	<b>Startinfo</b>										
	Antall enkeltceller	28	14	30	31	27	18	19		23,9	1,0
	Antall dubletter	6	0	6	4	5	2	6		4,1	0,3
	Antall tripletter+	1	1	0	0	0	0	3		0,7	0,2
	Totalt antall startgrupper	35	15	36	35	32	20	28		28,7	1,2
	<b>Sluttinfo</b>										
	Antall enkeltceller	0	0	1	0	0	1	0		0,3	0,1
	Antall kolonier	21	6	32	24	22	18	23		20,9	1,1
	Antall strengkolonier	3	7	2	4	1	2	0		2,7	0,3
	Totalt antall sluttgrupper	24	13	35	28	23	21	23		23,9	1,0
	Antall enkeltceller	0,000	0,000	0,028	0,000	0,000	0,050	0,000		0,011	0,003
	Antall kolonier	0,600	0,400	0,889	0,686	0,688	0,900	0,821		0,712	0,025
	Antall strengkolonier	0,086	0,467	0,056	0,114	0,031	0,100	0,000		0,122	0,022
	Overlevelse, koloni + strengkoloni	0,686	0,867	0,944	0,800	0,719	1,000	0,821		0,834	0,016
T-47D-P (0.3Gy)	<b>Start og sluttinfo</b>	22.jan	06.feb	03.sep	10.sep	17.sep	24.sep				
	<b>Startinfo</b>										
	Antall enkeltceller	17	11	31	33	34	36			27,0	1,7
	Antall dubletter	6	3	8	4	6	6			5,5	0,3
	Antall tripletter+	0	0	0	0	0	0			0,0	0,0
	Totalt antall startgrupper	23	14	39	37	40	42			32,5	1,9
	<b>Sluttinfo</b>										
	Antall enkeltceller	2	0	2	2	0	3			1,5	0,2
	Antall kolonier	19	10	32	27	37	33			26,3	1,7
	Antall strengkolonier	2	3	4	4	2	2			2,8	0,2
	Totalt antall sluttgrupper	23	13	38	33	39	38			30,7	1,8
	Antall enkeltceller	0,087	0,000	0,051	0,054	0,000	0,071			0,044	0,006
	Antall kolonier	0,826	0,714	0,821	0,730	0,925	0,786			0,800	0,013
	Antall strengkolonier	0,087	0,214	0,103	0,108	0,050	0,048			0,102	0,010
	Overlevelse, koloni + strengkoloni	0,913	0,929	0,923	0,838	0,975	0,833			0,902	0,009
T-47D	<b>Start og sluttinfo</b>	09.apr	16.apr	23.apr	29.okt	06.nov	19.mar	26.mar			
	<b>Startinfo</b>										
	Antall enkeltceller	22	28	24	25	25	25	27		25,1	0,3
	Antall dubletter	12	11	9	5	5	7	4		7,6	0,5
	Antall tripletter+	3	5	1	1	6	0	2		2,6	0,3
	Totalt antall startgrupper	37	44	34	31	36	32	33		35,3	0,6
	<b>Sluttinfo</b>										
	Antall enkeltceller	1	2	0	1	0	1	1		0,9	0,1
	Antall kolonier	27	41	29	27	25	23	21		27,6	0,9
	Antall strengkolonier	4	0	0	0	0	4	4		1,7	0,3
	Totalt antall sluttgrupper	32	43	29	28	25	28	26		30,1	0,9
	Antall enkeltceller	0,027	0,045	0,000	0,032	0,000	0,031	0,030		0,024	0,002
	Antall kolonier	0,730	0,932	0,853	0,871	0,694	0,719	0,636		0,776	0,016
	Antall strengkolonier	0,108	0,000	0,000	0,000	0,000	0,125	0,121		0,051	0,009
	Overlevelse, koloni + strengkoloni	0,838	0,932	0,853	0,871	0,694	0,844	0,758		0,827	0,011
T-47D (0.3Gy)	<b>Start og sluttinfo</b>	09.apr	16.apr	23.apr	29.okt	06.nov	24.sep	01.okt	01.okt		
	<b>Startinfo</b>										
	Antall enkeltceller	15	33	27	27	26	23	30	37	27,3	0,8
	Antall dubletter	14	9	7	7	12	3	5	10	8,4	0,5
	Antall tripletter+	3	5	2	1	2	6	1	3	2,9	0,2
	Totalt antall startgrupper	32	47	36	35	40	32	36	50	38,5	0,8
	<b>Sluttinfo</b>										
	Antall enkeltceller	0	0	1	0	0	0	0	2	0,4	0,1
	Antall kolonier	26	38	27	32	24	19	28	40	29,3	0,9
	Antall strengkolonier	2	4	3	0	1	2	4	0	2,0	0,2
	Totalt antall sluttgrupper	28	42	31	32	25	21	32	42	31,6	0,9
	Antall enkeltceller	0,000	0,000	0,028	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,008	0,002
	Antall kolonier	0,813	0,809	0,750	0,914	0,600	0,594	0,778	0,800	0,757	0,014
	Antall strengkolonier	0,063	0,085	0,083	0,000	0,025	0,063	0,111	0,000	0,054	0,005
	Overlevelse, koloni + strengkoloni	0,875	0,894	0,833	0,914	0,625	0,656	0,889	0,800	0,811	0,014
	Overlevelse, korrigert for mult.	M=	1,367							0,740	0,018

### III Cellulære hendelser som kan påvirke celleoverlevelsen

#### Dublettdeling

Dublettdeling betegner at en dublett splittes opp i to enkeltceller. Et eksempel på en dublettdeling er vist i figur 4.5, s.49.

De to enkeltcellene kan videre følge mange alternative hendelsesforløp, hvilke er representert i figuren nedenfor (figur D.1):



**Figur D.1: Alternative hendelsesforløp for en enkeltcelle fra en oppsplittet dublett**  
Skjemaet viser de alternative forløpene en enkeltcelle kan følge ut fra filmobservasjon.

Gjennomsnittlig dublettdelingshyppighet som følge av priming og effektbestråling ble beregnet i kalkuleringskjema ved å ta snittet av delingshyppigheten i hver filmet celleflaske.

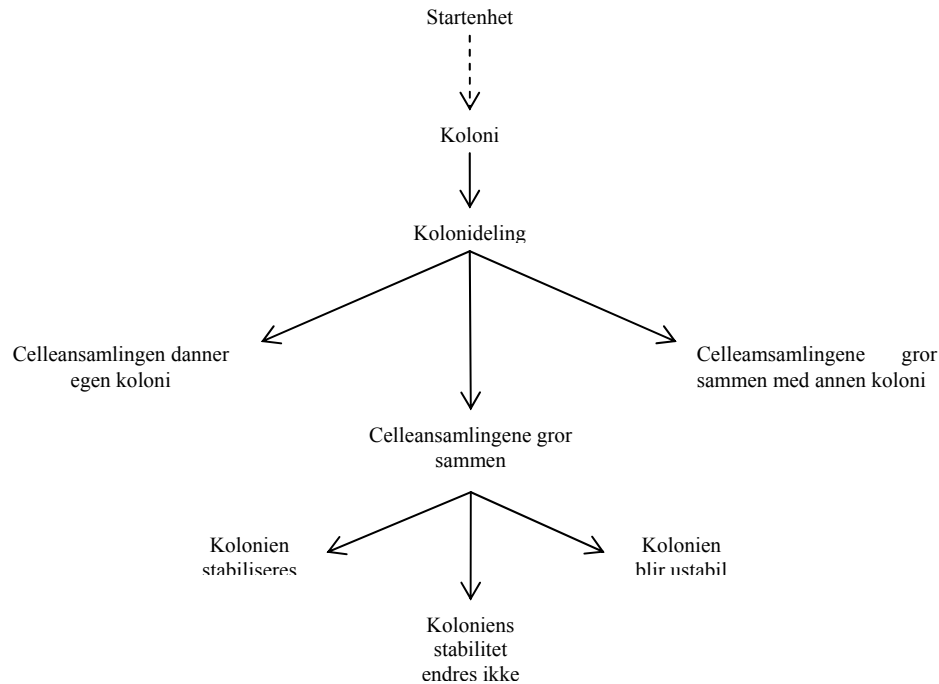
T-47D	<b>Start og sluttinfo</b>	09.apr	16.apr	23.apr	29.okt	06.nov	19.mar	26.mar		
	<b>Startinfo</b>									
	Antall enkeltceller	22	28	24	25	25	25	27	25,1	0,7
	Antall dubletter	12	11	9	5	5	7	4	7,6	1,2
	Antall trippletter+	3	5	1	1	6	0	2	2,6	0,8
	Totalt antall startgrupper	37	44	34	31	36	32	33	35,3	1,7
	<b>Antall celleoppsplittelser</b>	3	1	1	2	0	0	0	1,0	0,4
	Celle danner egen koloni	1	2	0	1	0	0	0	0,6	0,3
	Cellene gror sammen igjen	4	0	2	2	0	0	0	1,1	0,6
	Cellene gror sammen med annen koloni	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
	Uvisst	1	0	0	1	0	0	0	0,3	0,2
	<b>Opphav</b>									
	Enkeltcelle	3	1	0	1	0	0	0	0,7	0,4
	To enkeltceller	0	0	1	1	0	0	0	0,3	0,2
	Dublett	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
	<b>Celleoppsplitteshyppighet</b>	0,081	0,023	0,029	0,065	0	0	0	0,028	0,012
	Celle danner egen koloni	0,027	0,045	0	0,032	0	0	0	0,015	0,007
	Cellene gror sammen igjen	0,108	0	0,059	0,065	0	0	0	0,033	0,017
	Cellene gror sammen med annen koloni	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000
	Uvisst	0,027	0	0	0,032	0	0	0	0,008	0,005

T-47D (0.3Gy)	<b>Start og sluttinfo</b>	09.apr	16.apr	23.apr	29.okt	06.nov	24.sep	01.okt	01.okt		
	<b>Startinfo</b>										
	Antall enkeltceller	15	33	27	27	26	23	30	37	27,3	2,3
	Antall dubletter	14	9	7	7	12	3	5	10	8,4	1,3
	Antall trippletter+	3	5	2	1	2	6	1	3	2,9	0,6
	Totalt antall startgrupper	32	47	36	35	40	32	36	50	38,5	2,4
	<b>Antall celleoppsplittelser</b>	0	0	1	3	0	0	7	5	2,0	1,0
	Celle danner egen koloni	0	0	4	0	0	0	5	6	1,9	0,9
	Cellene gror sammen igjen	0	0	0	6	0	0	8	4	2,3	1,2
	Cellene gror sammen med annen koloni	0	0	0	0	0	0	1	0	0,1	0,1
	Uvisst	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
	<b>Opphav</b>										
	Enkeltcelle	0	0	1	3	0	0	7	2	1,6	0,9
	To enkeltceller	0	0	0	0	0	0	0	3	0,4	0,4
	Dublett	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
	<b>Celleoppsplittelseshyppighet</b>	0	0	0,028	0,086	0	0	0,194	0,1	0,051	0,025
	Celle danner egen koloni	0	0	0,111	0	0	0	0,139	0,12	0,046	0,023
	Cellene gror sammen igjen	0	0	0	0,171	0	0	0,222	0,08	0,059	0,032
	Cellene gror sammen med annen koloni	0	0	0	0	0	0	0,028	0	0,003	0,003
	Uvisst	0	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000
T-47D-P	<b>Start og sluttinfo</b>	22.jan	06.feb	03.sep	10.sep	17.sep	19.mar	26.mar		Snitt	St.feil
	<b>Startinfo</b>										
	Antall enkeltceller	28	14	30	31	27	18	19		23,9	2,5
	Antall dubletter	6	0	6	4	5	2	6		4,1	0,9
	Antall trippletter+	1	1	0	0	0	0	3		0,7	0,4
	Totalt antall startgrupper	35	15	36	35	32	20	28		28,7	3,1
	<b>Antall celleoppsplittelser</b>	2	2	7	2	2	1	0		2,3	0,8
	Celle danner egen koloni	3	1	4	2	1	2	0		1,9	0,5
	Cellene gror sammen igjen	0	2	8	2	2	0	0		2,0	1,1
	Cellene gror sammen med annen koloni	0	1	2	0	1	0	0		0,6	0,3
	Uvisst	1	0	0	0	0	0	0		0,1	0,1
	<b>Opphav</b>										
	Enkeltcelle	2	0	3	2	2	1	0		1,4	0,4
	To enkeltceller	0	0	0	0	0	0	0		0,0	0,0
	Dublett	0	0	4	0	0	0	0		0,6	0,6
	<b>Celleoppsplittelseshyppighet</b>	0,057	0,133	0,194	0,057	0,063	0,050	0,000		0,079	0,024
	Celle danner egen koloni	0,086	0,067	0,111	0,057	0,031	0,100	0,000		0,065	0,015
	Cellene gror sammen igjen	0,000	0,133	0,222	0,057	0,063	0,000	0,000		0,068	0,032
	Cellene gror sammen med annen koloni	0,000	0,067	0,056	0,000	0,031	0,000	0,000		0,022	0,011
	Uvisst	0,029	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,004	0,004
T-47D-P (0.3Gy)	<b>Start og sluttinfo</b>	22.jan	06.feb	03.sep	10.sep	17.sep	24.sep				
	<b>Startinfo</b>										
	Antall enkeltceller	17	11	31	33	34	36			27,0	4,2
	Antall dubletter	6	3	8	4	6	6			5,5	0,7
	Antall trippletter+	0	0	0	0	0	0			0,0	0,0
	Totalt antall startgrupper	23	14	39	37	40	42			32,5	4,6
	<b>Antall celleoppsplittelser</b>	3	0	3	2	2	0			1,7	0,6
	Celle danner egen koloni	3	0	2	1	0	0			1,0	0,5
	Cellene gror sammen igjen	0	0	4	3	4	0			1,8	0,8
	Cellene gror sammen med annen koloni	2	0	0	0	0	0			0,3	0,3
	Uvisst	1	0	0	0	0	0			0,2	0,2
	<b>Opphav</b>										
	Enkeltcelle	2	0	3	1	2	0			1,3	0,5
	To enkeltceller	0	0	0	0	0	0			0,0	0,0
	Dublett	1	0	0	1	0	0			0,3	0,2
	<b>Celleoppsplittelseshyppighet</b>	0,130	0,000	0,077	0,054	0,050	0,000			0,052	0,020
	Celle danner egen koloni	0,130	0,000	0,051	0,027	0,000	0,000			0,035	0,021
	Cellene gror sammen igjen	0,000	0,000	0,103	0,081	0,100	0,000			0,047	0,021
	Cellene gror sammen med annen koloni	0,087	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000			0,014	0,014
	Uvisst	0,043	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000			0,007	0,007

## Kolonideling

Kolonideling betegner at en koloni eller strengkoloni splittes opp i to deler, der hver del inneholder minimum 2 celler. Et eksempel på en kolonideling er vist i figur 4.6, s.50.

De to celleansamlingene kan videre følge mange alternative hendelsesforløp, hvilke er representert i figuren nedenfor (figur D.2):



### Figur D.2: Alternative hendelsesforløp for celleansamlingene fra kolonideling

Skjemaet viser de alternative forløpene en celleansamling kan følge, på bakgrunn av observasjoner i filmene. Der ansamlingen vekselvirker med en annen celleenhet, har eventuelle observerte stabilitetsendringer blitt registrert

Gjennomsnittlig kolonidelingshyppighet som følge av priming og effektbestråling ble beregnet i kalkuleringsskjema ved å ta snittet av delingshyppigheten i hver filmet celleflaske.



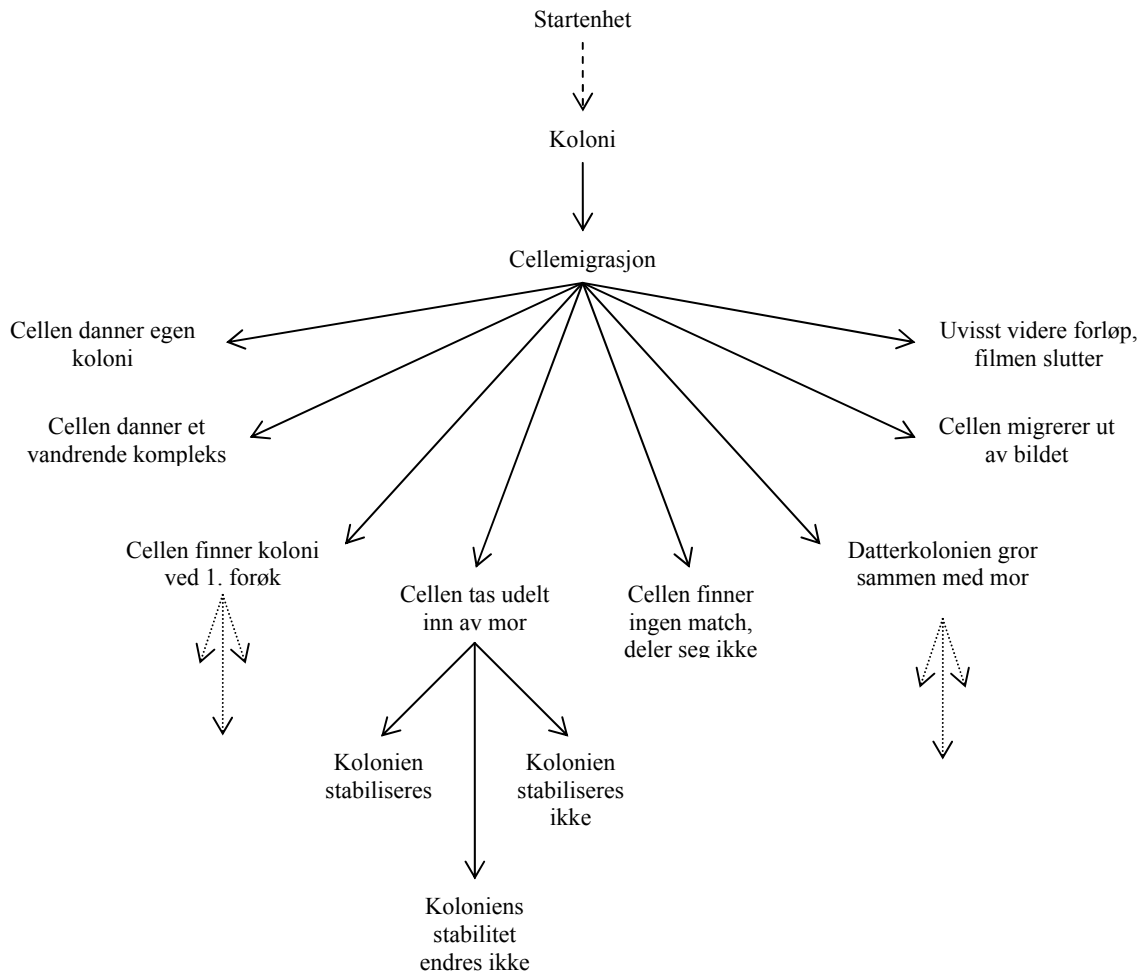
T-47D	<b>Start og sluttinfo</b>	09.apr	16.apr	23.apr	29.okt	06.nov	19.mar	26.mar		
	<b>Startinfo</b>									
	Antall enkeltceller	22	28	24	25	25	25	27	25,1	0,7
	Antall dubletter	12	11	9	5	5	7	4	7,6	1,2
	Antall tripletter+	3	5	1	1	6	0	2	2,6	0,8
	Totalt antall startgrupper	37	44	34	31	36	32	33	35,3	1,7
	<b>Antall kolonidelinger</b>	0	3	1	1	1	5	0	1,6	0,7
	Kolonien stabiliseres	0	3	0	2	0	0	0	0,7	0,5
	Kolonien blir ustabil*	0	1	0	0	0	6	0	1,0	0,8
	Koloniens stabilitet endres ikke	0	2	2	0	2	4	0	1,4	0,6
	Celleansamling danner egen koloni	0	4	0	2	0	0	0	0,9	0,6
	Celleansamlingene gror sammen, kolonien stabiliseres	0	2	0	0	0	0	0	0,3	0,3
	Celleansamlingene gror sammen, kolonien blir ustabil	0	0	2	0	0	0	0	0,3	0,3
	Celleansamlingene gror sammen, koloniens stabilitet endres ikke	0	0	0	0	2	10	0	1,7	1,4
	Totalt antall celleansamlinger som gror sammen med koloni	0	2	2	0	2	10	0	2,3	1,3
	Celleansamling gror sammen med annen koloni	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
	<b>Kolonidelingshyppighet</b>	0,000	0,068	0,029	0,032	0,028	0,156	0,000	0,045	0,021
	Kolonien stabiliseres	0,000	0,068	0,000	0,065	0,000	0,000	0,000	0,019	0,012
	Kolonien blir ustabil*	0,000	0,023	0,000	0,000	0,000	0,188	0,000	0,030	0,026
	Koloniens stabilitet endres ikke	0,000	0,045	0,059	0,000	0,056	0,125	0,000	0,041	0,017
	Celleansamling danner egen koloni	0,000	0,091	0,000	0,065	0,000	0,000	0,000	0,022	0,015
	Celleansamlingene gror sammen, kolonien stabiliseres	0,000	0,045	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,006
	Celleansamlingene gror sammen, kolonien blir ustabil	0,000	0,000	0,059	0,000	0,000	0,000	0,000	0,008	0,008
	Celleansamlingene gror sammen, koloniens stabilitet endres ikke	0,000	0,000	0,000	0,000	0,056	0,313	0,000	0,053	0,044
	Totalt antall celleansamlinger som gror sammen med koloni	0,000	0,045	0,059	0,000	0,056	0,313	0,000	0,067	0,042
	Celleansamling gror sammen med annen koloni	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
T-47D (0.3Gy)	<b>Start og sluttinfo</b>	09.apr	16.apr	23.apr	29.okt	06.nov	24.sep	01.okt	01.okt	
	<b>Startinfo</b>									
	Antall enkeltceller	15	33	27	27	26	23	30	37	27,3
	Antall dubletter	14	9	7	7	12	3	5	10	8,4
	Antall tripletter+	3	5	2	1	2	6	1	3	2,9
	Totalt antall startgrupper	32	47	36	35	40	32	36	50	38,5
	<b>Antall kolonidelinger</b>	1	1	5	1	0	2	5	2	2,1
	Kolonien stabiliseres	0	0	1	0	0	2	2	1	0,8
	Kolonien blir ustabil*	0	0	1	0	0	0	2	1	0,5
	Koloniens stabilitet endres ikke	2	2	8	2	0	2	6	2	3,0
	Celleansamling danner egen koloni	0	2	2	2	0	4	1	2	1,6
	Celleansamlingene gror sammen, kolonien stabiliseres	0	0	2	0	0	0	0	0	0,3
	Celleansamlingene gror sammen, kolonien blir ustabil	0	0	0	0	0	0	2	0	0,3
	Celleansamlingene gror sammen, koloniens stabilitet endres ikke	2	0	6	0	0	0	6	2	2,0
	Totalt antall celleansamlinger som gror sammen med koloni	2	0	8	0	0	0	8	2	2,5
	Celleansamling gror sammen med annen koloni	0	0	0	0	0	0	1	0	0,1
	<b>Kolonidelingshyppighet</b>	0,031	0,021	0,139	0,029	0,000	0,063	0,139	0,040	0,058
	Kolonien stabiliseres	0,000	0,000	0,028	0,000	0,000	0,063	0,056	0,020	0,021
	Kolonien blir ustabil*	0,000	0,000	0,028	0,000	0,000	0,000	0,056	0,020	0,013
	Koloniens stabilitet endres ikke	0,063	0,043	0,222	0,057	0,000	0,063	0,167	0,040	0,082
	Celleansamling danner egen koloni	0,000	0,043	0,056	0,057	0,000	0,125	0,028	0,040	0,044
	Celleansamlingene gror sammen, kolonien stabiliseres	0,000	0,000	0,056	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007
	Celleansamlingene gror sammen, kolonien blir ustabil	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,056	0,000	0,007
	Celleansamlingene gror sammen, koloniens stabilitet endres ikke	0,063	0,000	0,167	0,000	0,000	0,000	0,167	0,040	0,054
	Totalt antall celleansamlinger som gror sammen med koloni	0,063	0,000	0,222	0,000	0,000	0,000	0,222	0,040	0,068
	Celleansamling gror sammen med annen koloni	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,028	0,000	0,003

T-47D-P	<b>Start og sluttinfo</b>	22.jan	06.feb	03.sep	10.sep	17.sep	19.mar	26.mar		
	<b>Startinfo</b>									
	Antall enkeltceller	28	14	30	31	27	18	19	23,9	2,5
	Antall dubletter	6	0	6	4	5	2	6	4,1	0,9
	Antall tripletter+	1	1	0	0	0	0	3	0,7	0,4
	Totalt antall startgrupper	35	15	36	35	32	20	28	28,7	3,1
	<b>Antall kolonidelinger</b>	0	1	6	4	1	3	1	2,3	0,8
	Kolonien stabiliseres	0	0	7	0	1	0	2	1,4	1,0
	Kolonien blir ustabil*	0	0	1	0	0	0	0	0,1	0,1
	Koloniens stabilitet endres ikke	0	2	4	8	1	6	0	3,0	1,2
	Celleansamling danner egen koloni	0	0	6	0	0	6	2	2,0	1,1
	Celleansamlingene gror sammen, kolonien stabiliseres	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
	Celleansamlingene gror sammen, kolonien blir ustabil	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
	Celleansamlingene gror sammen, koloniens stabilitet endres ikke	0	2	6	8	0	0	0	2,3	1,3
	Totalt antall celleansamlinger som gror sammen med koloni	0	2	6	8	0	0	0	2,3	1,3
	Celleansamling gror sammen med annen koloni	0	0	0	0	2	0	0	0,3	0,3
	<b>Kolonidelingshyppighet</b>	0,000	0,067	0,167	0,114	0,031	0,150	0,036	0,081	0,024
	Kolonien stabiliseres	0,000	0,000	0,194	0,000	0,031	0,000	0,071	0,042	0,027
	Kolonien blir ustabil*	0,000	0,000	0,028	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,004
	Koloniens stabilitet endres ikke	0,000	0,133	0,111	0,229	0,031	0,300	0,000	0,115	0,044
	Celleansamling danner egen koloni	0,000	0,000	0,167	0,000	0,000	0,300	0,071	0,077	0,044
	Celleansamlingene gror sammen, kolonien stabiliseres	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Celleansamlingene gror sammen, kolonien blir ustabil	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Celleansamlingene gror sammen, koloniens stabilitet endres ikke	0,000	0,133	0,167	0,229	0,000	0,000	0,000	0,076	0,037
	Totalt antall celleansamlinger som gror sammen med koloni	0,000	0,133	0,167	0,229	0,000	0,000	0,000	0,076	0,037
	Celleansamling gror sammen med annen koloni	0,000	0,000	0,000	0,000	0,063	0,000	0,000	0,009	0,009
T-47D-P (0.3Gy)	<b>Start og sluttinfo</b>	22.jan	06.feb	03.sep	10.sep	17.sep	24.sep			
	<b>Startinfo</b>									
	Antall enkeltceller	17	11	31	33	34	36	27,0	4,2	
	Antall dubletter	6	3	8	4	6	6	5,5	0,7	
	Antall tripletter+	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0	
	Totalt antall startgrupper	23	14	39	37	40	42	32,5	4,6	
	<b>Antall kolonidelinger</b>	2	2	2	4	6	4	3,3	0,7	
	Kolonien stabiliseres	1	0	3	2	4	1	1,8	0,6	
	Kolonien blir ustabil*	0	0	0	2	0	0	0,3	0,3	
	Koloniens stabilitet endres ikke	3	4	1	4	8	7	4,5	1,1	
	Celleansamling danner egen koloni	2	0	3	4	2	4	2,5	0,6	
	Celleansamlingene gror sammen, kolonien stabiliseres	2	0	0	0	0	0	0,3	0,3	
	Celleansamlingene gror sammen, kolonien blir ustabil	0	0	0	2	0	0	0,3	0,3	
	Celleansamlingene gror sammen, koloniens stabilitet endres ikke	0	4	0	2	6	4	2,7	1,0	
	Totalt antall celleansamlinger som gror sammen med koloni	2	4	0	4	6	4	3,3	0,8	
	Celleansamling gror sammen med annen koloni	0	0	1	0	4	0	0,8	0,7	
	<b>Kolonidelingshyppighet</b>	0,087	0,143	0,051	0,108	0,150	0,095	0,106	0,015	
	Kolonien stabiliseres	0,043	0,000	0,077	0,054	0,100	0,024	0,050	0,015	
	Kolonien blir ustabil*	0,000	0,000	0,000	0,054	0,000	0,000	0,009	0,009	
	Koloniens stabilitet endres ikke	0,130	0,286	0,026	0,108	0,200	0,167	0,153	0,036	
	Celleansamling danner egen koloni	0,087	0,000	0,077	0,108	0,050	0,095	0,070	0,016	
	Celleansamlingene gror sammen, kolonien stabiliseres	0,087	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,014	0,014	
	Celleansamlingene gror sammen, kolonien blir ustabil	0,000	0,000	0,000	0,054	0,000	0,000	0,009	0,009	
	Celleansamlingene gror sammen, koloniens stabilitet endres ikke	0,000	0,286	0,000	0,054	0,150	0,095	0,098	0,044	
	Totalt antall celleansamlinger som gror sammen med koloni	0,087	0,286	0,000	0,108	0,150	0,095	0,121	0,039	
	Celleansamling gror sammen med annen koloni	0,000	0,000	0,026	0,000	0,100	0,000	0,021	0,016	

## Cellemigrasjon

Cellemigrasjon er når en enkeltcelle løsriver seg fra en koloni ved at den bryter sine bindinger til kolonien. Et eksempel på en cellemigrasjon er vist i figur 4.7, s.52.

En migrasjonscelle kan følge mange alternative hendelsesforløp, hvilke er representert i figuren nedenfor (figur D.3)



**Figur D.3: Alternative hendelsesforløp for migrasjonsceller**

Skjemaet viser de alternative forløpene en migrasjonscelle kan følge på bakgrunn av filmobservasjon. Der cellen vekselvirker med en annen celleenhet, har eventuelle observerte stabilitetsendringer blitt registrert

Gjennomsnittlig migrasjonshyppigheten som følge av priming og effektbestråling ble beregnet i kalkuleringsskjema ved å ta snittet av migrasjonshyppigheten i hver filmet celleflaske.

T-47D	Start og sluttinfo	09.apr	16.apr	23.apr	29.okt	06.nov	19.mar	26.mar		
	<b>Startinfo</b>									
	Antall enkeltceller	22	28	24	25	25	25	27	25,1	0,7
	Antall dubletter	12	11	9	5	5	7	4	7,6	1,2
	Antall tripletter+	3	5	1	1	6	0	2	2,6	0,8
	Totalt antall startgrupper	37	44	34	31	36	32	33	35,3	1,7
	<b>Antall celler morkolonien sender ut</b>	1	2	1	2	0	5	2	1,9	0,6
	Morkolonien stabiliseres	0	1	1	1	0	0	0	0,4	0,2
	Morkolonien blir ustabil	0	0	0	0	0	5	0	0,7	0,7
	Morkoloniens stabilitet endres ikke	1	1	0	1	0	0	2	0,7	0,3
	Cellen danner egen koloni	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
	Cellen danner egen strengkolonikoloni	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
	Datterkolonien gror sammen med mor, mor stabiliseres	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
	Datterkolonien gror sammen med mor, mor blir ustabil	0	1	0	0	0	0	0	0,1	0,1
	Datterkolonien gror sammen med mor, mors stabilitet endres ikke	0	0	1	0	0	5	0	0,9	0,7
	Totalt antall datterkolonier som gror sammen med mor	0	1	1	0	0	5	0	1,0	0,7
	Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien stabiliseres	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
	Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien blir ustabil	0	0	0	0	0	0	1	0,1	0,1
	Cellen finner koloni ved 1. forsøk, koloniens stabilitet endres ikke	0	1	0	0	0	0	0	0,1	0,1
	Totalt antall celler som finner koloni ved 1.forsøk	0	1	0	0	0	0	1	0,3	0,2
	Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabiliseres	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
	Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor blir ustabil	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
	Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabilitet endres ikke	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
	Totalt antall celler som tas udeelt inn igjen av mor	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
	Cellen finner ingen match/ deler seg ikke	0	0	0	2	0	0	1	0,4	0,3
	Cellen danner vandrende kompleks	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
	Cellen migrerer ut av bilde	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
	Uvisst hva som skjer med cellen, filmen slutter	1	0	0	0	0	0	0	0,1	0,1
	<b>Antall celler morkolonien sender ut</b>	0,02703	0,04545	0,02941	0,06452	0	0,15625	0,06061	0,055	0,019
	Morkolonien stabiliseres	0	0,02273	0,02941	0,03226	0	0	0	0,012	0,006
	Morkolonien blir ustabil	0	0	0	0	0	0,15625	0	0,022	0,022
	Morkoloniens stabilitet endres ikke	0,02703	0,02273	0	0,03226	0	0	0,06061	0,020	0,009
	Cellen danner egen koloni	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000
	Cellen danner egen strengkolonikoloni	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000
	Datterkolonien gror sammen med mor, mor stabiliseres	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000
	Datterkolonien gror sammen med mor, mor blir ustabil	0	0,02273	0	0	0	0	0	0,003	0,003
	Datterkolonien gror sammen med mor, mors stabilitet endres ikke	0	0	0,02941	0	0	0,15625	0	0,027	0,022
	Totalt antall datterkolonier som gror sammen med mor	0	0,02273	0,02941	0	0	0,15625	0	0,030	0,022
	Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien stabiliseres	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000
	Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien blir ustabil	0	0	0	0	0	0	0,0303	0,004	0,004
	Cellen finner koloni ved 1. forsøk, koloniens stabilitet endres ikke	0	0,02273	0	0	0	0	0	0,003	0,003
	Totalt antall celler som finner koloni ved 1.forsøk	0	0,02273	0	0	0	0	0,0303	0,008	0,005
	Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabiliseres	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000
	Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor blir ustabil	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000
	Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabilitet endres ikke	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000
	Totalt antall celler som tas udeelt inn igjen av mor	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000
	Cellen finner ingen match/ deler seg ikke	0	0	0	0,06452	0	0	0,0303	0,014	0,010
	Cellen danner vandrende kompleks	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000
	Cellen migrerer ut av bilde	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000
	Uvisst hva som skjer med cellen, filmen slutter	0,02703	0	0	0	0	0	0	0,004	0,004

T-47D (0.3Gy)	Start og sluttinfo	09.apr	16.apr	23.apr	29.okt	06.nov	24.sep	01.okt	01.okt		
	<b>Startinfo</b>										
	Antall enkeltceller	15	33	27	27	26	23	30	37	27,3	2,3
	Antall dubletter	14	9	7	7	12	3	5	10	8,4	1,3
	Antall tripletter+	3	5	2	1	2	6	1	3	2,9	0,6
	Totalt antall startgrupper	32	47	36	35	40	32	36	50	38,5	2,4
	<b>Antall celler morkolonien sender ut</b>	1	4	4	2	1	1	8	5	3,3	0,9
	Morkolonien stabiliseres	0	2	2	0	0	0	1	3	1,0	0,4
	Morkolonien blir ustabil	0	1	0	0	0	0	0	1	0,3	0,2
	Morkoloniens stabilitet endres ikke	1	1	2	1	1	1	5	1	1,6	0,5
	Cellen danner egen koloni	0	1	0	0	0	0	0	1	0,3	0,2
	Cellen danner egen strengkolonikoloni	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
	Datterkolonien gror sammen med mor, mor stabiliseres	0	0	1	1	0	1	1	1	0,6	0,2
	Datterkolonien gror sammen med mor, mor blir ustabil	0	1	0	0	0	0	2	0	0,4	0,3
	Datterkolonien gror sammen med mor, mors stabilitet endres ikke	0	1	1	0	1	0	1	0	0,5	0,2
	Totalt antall datterkolonier som gror sammen med mor	0	2	2	1	1	1	4	1	1,5	0,4
	Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien stabiliseres	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
	Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien blir ustabil	0	0	0	0	0	0	2	0	0,3	0,3
	Cellen finner koloni ved 1. forsøk, koloniens stabilitet endres ikke	0	1	0	0	0	0	1	1	0,4	0,2
	Totalt antall celler som finner koloni ved 1.forsøk	0	1	0	0	0	0	3	1	0,6	0,4
	Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabiliseres	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
	Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor blir ustabil	1	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0,1
	Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabilitet endres ikke	0	0	0	1	0	0	0	1	0,3	0,2
	Totalt antall celler som tas udelte inn igjen av mor	1	0	0	1	0	0	0	1	0,4	0,2
	Cellen finner ingen match/ deler seg ikke	0	0	1	0	0	0	0	1	0,3	0,2
	Cellen danner vandrende kompleks	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
	Cellen migrerer ut av bilde	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
	Uvisst hva som skjer med cellen, filmen slutter	0	0	1	0	0	0	1	0	0,3	0,2
	<b>Antall celler morkolonien sender ut</b>	0,03125	0,08511	0,11111	0,05714	0,025	0,03125	0,22222	0,1	0,083	0,023
	Morkolonien stabiliseres	0	0,04255	0,05556	0	0	0	0,02778	0,06	0,023	0,009
	Morkolonien blir ustabil	0	0,02128	0	0	0	0	0	0,02	0,005	0,003
	Morkoloniens stabilitet endres ikke	0,03125	0,02128	0,05556	0,02857	0,025	0,03125	0,13889	0,02	0,044	0,014
	Cellen danner egen koloni	0	0,02128	0	0	0	0	0	0,02	0,005	0,003
	Cellen danner egen strengkolonikoloni	0	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000
	Datterkolonien gror sammen med mor, mor stabiliseres	0	0	0,02778	0,02857	0	0,03125	0,02778	0,02	0,017	0,005
	Datterkolonien gror sammen med mor, mor blir ustabil	0	0,02128	0	0	0	0	0,05556	0	0,010	0,007
	Datterkolonien gror sammen med mor, mors stabilitet endres ikke	0	0,02128	0,02778	0	0,025	0	0,02778	0	0,013	0,005
	Totalt antall datterkolonier som gror sammen med mor	0	0,04255	0,05556	0,02857	0,025	0,03125	0,11111	0,02	0,039	0,012
	Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien stabiliseres	0	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000
	Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien blir ustabil	0	0	0	0	0	0	0,05556	0	0,007	0,007
	Cellen finner koloni ved 1. forsøk, koloniens stabilitet endres ikke	0	0,02128	0	0	0	0	0,02778	0,02	0,009	0,004
	Totalt antall celler som finner koloni ved 1.forsøk	0	0,02128	0	0	0	0	0,08333	0,02	0,016	0,010
	Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabiliseres	0	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000
	Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor blir ustabil	0,03125	0	0	0	0	0	0	0	0,004	0,004
	Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabilitet endres ikke	0	0	0	0,02857	0	0	0	0,02	0,006	0,004
	Totalt antall celler som tas udelte inn igjen av mor	0,03125	0	0	0,02857	0	0	0	0,02	0,010	0,005
	Cellen finner ingen match/ deler seg ikke	0	0	0,02778	0	0	0	0	0,02	0,006	0,004
	Cellen danner vandrende kompleks	0	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000
	Cellen migrerer ut av bilde	0	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000
	Uvisst hva som skjer med cellen, filmen slutter	0	0	0,02778	0	0	0	0,02778	0	0,007	0,005

T-47D- P	Start og sluttinfo	22.jan	06.feb	03.sep	10.sep	17.sep	19.mar	26.mar	Gj.snitt	St.feil
	<b>Startinfo</b>									
	Antall enkeltceller	28	14	30	31	27	18	19	23,9	2,5
	Antall dubletter	6	0	6	4	5	2	6	4,1	0,9
	Antall tripletter+	1	1	0	0	0	0	3	0,7	0,4
	Totalt antall startgrupper	35	15	36	35	32	20	28	28,7	3,1
	<b>Antall celler morkolonien sender ut</b>	4	6	3	7	2	0	2	3,4	0,9
	Morkolonien stabiliseres	0	2	1	0	0	0	0	0,4	0,3
	Morkolonien blir ustabil	0	0	0	2	0	0	0	0,3	0,3
	Morkoloniens stabilitet endres ikke	4	3	2	5	2	0	2	2,6	0,6
	Cellen danner egen koloni	0	0	0	1	0	0	0	0,1	0,1
	Cellen danner egen strengkolonikoloni	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
	Datterkolonien gror sammen med mor, mor stabiliseres	0	2	2	1	0	0	0	0,7	0,4
	Datterkolonien gror sammen med mor, mor blir ustabil	0	1	0	0	0	0	0	0,1	0,1
	Datterkolonien gror sammen med mor, mors stabilitet endres ikke	1	1	0	5	0	0	0	1,0	0,7
	Totalt antall datterkolonier som gror sammen med mor	1	4	2	6	0	0	0	1,9	0,9
	Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien stabiliseres	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
	Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien blir ustabil	0	0	0	0	0	0	1	0,1	0,1
	Cellen finner koloni ved 1. forsøk, koloniens stabilitet endres ikke	1	0	0	0	1	0	0	0,3	0,2
	Totalt antall celler som finner koloni ved 1.forsøk	1	0	0	0	1	0	1	0,4	0,2
	Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabiliseres	1	0	1	0	0	0	0	0,3	0,2
	Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor blir ustabil	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
	Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabilitet endres ikke	0	2	0	0	1	0	0	0,4	0,3
	Totalt antall celler som tas udeelt inn igjen av mor	1	2	1	0	1	0	0	0,7	0,3
	Cellen finner ingen match/ deler seg ikke	0	0	0	0	0	0	1	0,1	0,1
	Cellen danner vandrende kompleks	1	0	0	0	0	0	0	0,1	0,1
	Cellen migrerer ut av bilde	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
	Uvisst hva som skjer med cellen, filmen slutter	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
	<b>Antall celler morkolonien sender ut</b>	0,11429	0,4	0,08333	0,2	0,0625	0	0,07143	0,133	0,050
	Morkolonien stabiliseres	0	0,13333	0,02778	0	0	0	0	0,023	0,019
	Morkolonien blir ustabil	0	0	0	0,05714	0	0	0	0,008	0,008
	Morkoloniens stabilitet endres ikke	0,11429	0,2	0,05556	0,14286	0,0625	0	0,07143	0,092	0,025
	Cellen danner egen koloni	0	0	0	0,02857	0	0	0	0,004	0,004
	Cellen danner egen strengkolonikoloni	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000
	Datterkolonien gror sammen med mor, mor stabiliseres	0	0,13333	0,05556	0,02857	0	0	0	0,031	0,019
	Datterkolonien gror sammen med mor, mor blir ustabil	0	0,06667	0	0	0	0	0	0,010	0,010
	Datterkolonien gror sammen med mor, mors stabilitet endres ikke	0,02857	0,06667	0	0,14286	0	0	0	0,034	0,020
	Totalt antall datterkolonier som gror sammen med mor	0,02857	0,26667	0,05556	0,17143	0	0	0	0,075	0,039
	Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien stabiliseres	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000
	Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien blir ustabil	0	0	0	0	0	0	0,03571	0,005	0,005
	Cellen finner koloni ved 1. forsøk, koloniens stabilitet endres ikke	0,02857	0	0	0	0,03125	0	0	0,009	0,006
	Totalt antall celler som finner koloni ved 1.forsøk	0,02857	0	0	0	0,03125	0	0,03571	0,014	0,006
	Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabiliseres	0,02857	0	0,02778	0	0	0	0	0,008	0,005
	Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor blir ustabil	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000
	Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabilitet endres ikke	0	0,13333	0	0	0,03125	0	0	0,024	0,019
	Totalt antall celler som tas udeelt inn igjen av mor	0,02857	0,13333	0,02778	0	0,03125	0	0	0,032	0,018
	Cellen finner ingen match/ deler seg ikke	0	0	0	0	0	0	0,03571	0,005	0,005
	Cellen danner vandrende kompleks	0,02857	0	0	0	0	0	0	0,004	0,004
	Cellen migrerer ut av bilde	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000
	Uvisst hva som skjer med cellen, filmen slutter	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000

T-47D- P (0.3Gy)	Start og sluttinfo	22.jan	06.feb	03.sep	10.sep	17.sep	24.sep		
	<b>Startinfo</b>								
	Antall enkeltceller	17	11	31	33	34	36	27,0	4,2
	Antall dubletter	6	3	8	4	6	6	5,5	0,7
	Antall tripletter+	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
	Totalt antall startgrupper	23	14	39	37	40	42	32,5	4,6
	<b>Antall celler morkolonien sender ut</b>	1	3	7	16	3	9	6,5	2,2
	Morkolonien stabiliseres	1	0	1	0	0	0	0,3	0,2
	Morkolonien blir ustabil	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
	Morkoloniens stabilitet endres ikke	0	3	6	15	3	9	6,0	2,2
	Cellen danner egen koloni	0	0	1	1	1	0	0,5	0,2
	Cellen danner egen strengkolonikoloni	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
	Datterkolonien gror sammen med mor, mor stabiliseres	0	0	2	0	0	2	0,7	0,4
	Datterkolonien gror sammen med mor, mor blir ustabil	0	0	2	8	0	0	1,7	1,3
	Datterkolonien gror sammen med mor, mors stabilitet endres ikke	0	1	1	4	1	0	1,2	0,6
	Totalt antall datterkolonier som gror sammen med mor	0	1	5	12	1	2	3,5	1,8
	Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien stabiliseres	0	0	0	0	0	1	0,2	0,2
	Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien blir ustabil	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
	Cellen finner koloni ved 1. forsøk, koloniens stabilitet endres ikke	0	0	0	2	0	1	0,5	0,3
	Totalt antall celler som finner koloni ved 1.forsøk	0	0	0	2	0	2	0,7	0,4
	Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabiliseres	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
	Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor blir ustabil	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
	Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabilitet endres ikke	0	2	1	0	1	1	0,8	0,3
	Totalt antall celler som tas udeelt inn igjen av mor	0	2	1	0	1	1	0,8	0,3
	Cellen finner ingen match/ deler seg ikke	0	0	0	0	0	1	0,2	0,2
	Cellen danner vandrende kompleks	0	0	0	1	0	0	0,2	0,2
	Cellen migrerer ut av bilde	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
	Uvisst hva som skjer med cellen, filmen slutter	1	0	0	0	0	4	0,8	0,7
	<b>Antall celler morkolonien sender ut</b>	0,04348	0,21429	0,17949	0,43243	0,075	0,21429	0,193	0,056
	Morkolonien stabiliseres	0,04348	0	0,02564	0	0	0	0,012	0,008
	Morkolonien blir ustabil	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000
	Morkoloniens stabilitet endres ikke	0	0,21429	0,15385	0,40541	0,075	0,21429	0,177	0,057
	Cellen danner egen koloni	0	0	0,02564	0,02703	0,025	0	0,013	0,006
	Cellen danner egen strengkolonikoloni	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000
	Datterkolonien gror sammen med mor, mor stabiliseres	0	0	0,05128	0	0	0,04762	0,016	0,010
	Datterkolonien gror sammen med mor, mor blir ustabil	0	0	0,05128	0,21622	0	0	0,045	0,035
	Datterkolonien gror sammen med mor, mors stabilitet endres ikke	0	0,07143	0,02564	0,10811	0,025	0	0,038	0,018
	Totalt antall datterkolonier som gror sammen med mor	0	0,07143	0,12821	0,32432	0,025	0,04762	0,099	0,048
	Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien stabiliseres	0	0	0	0	0	0,02381	0,004	0,004
	Cellen finner koloni ved 1. forsøk, kolonien blir ustabil	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000
	Cellen finner koloni ved 1. forsøk, koloniens stabilitet endres ikke	0	0	0	0,05405	0	0,02381	0,013	0,009
	Totalt antall celler som finner koloni ved 1.forsøk	0	0	0	0,05405	0	0,04762	0,017	0,011
	Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabiliseres	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000
	Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor blir ustabil	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000
	Cellen (udelt) tas inn igjen av mor, mor stabilitet endres ikke	0	0,14286	0,02564	0	0,025	0,02381	0,036	0,022
	Totalt antall celler som tas udeelt inn igjen av mor	0	0,14286	0,02564	0	0,025	0,02381	0,036	0,022
	Cellen finner ingen match/ deler seg ikke	0	0	0	0	0	0,02381	0,004	0,004
	Cellen danner vandrende kompleks	0	0	0	0,02703	0	0	0,005	0,005
	Cellen migrerer ut av bilde	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000
	Uvisst hva som skjer med cellen, filmen slutter	0,04348	0	0	0	0	0,09524	0,023	0,016

## Mediumskift

Ved mediumskift kan celler forlate bildesnittet. Andelen slike celler ble anslått i følgende kalkuleringskjema:

T-47D	09.apr	16.apr	23.apr	29.okt	06.nov	19.mar	26.mar		
<b>Før mediumskift</b>									
Antall enkeltceller	5	6	5	4	8	1	2	4,4	0,9
Antall kolonier	31	40	29	28	25	25	26	29,1	2,0
Antall strengkolonier	1	1	0	0	0	4	0	0,9	0,6
Totalt	37	47	34	32	33	30	28	34,4	2,4
<b>Etter mediumskift</b>									
Antall enkeltceller	1	3	0	4	2	1	0	1,6	0,6
Antall kolonier	32	40	29	28	25	24	26	29,1	2,1
Antall strengkolonier	0	1	0	0	0	5	0	0,9	0,7
Totalt	33	44	29	32	27	30	26	31,6	2,3
<b>Bortfall</b>									
Andel enkeltceller	0,800	0,500	1,000	0,000	0,750	0,000	1,000	0,579	0,163
Andel kolonier	-0,032	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,000	0,001	0,008
Andel strengkolonier	1,000	0,000				-0,250		0,250	0,250
Totalt andel bortfalte enheter	0,108	0,064	0,147	0,000	0,182	0,000	0,071	0,082	0,026
T-47D 0.3Gy	09.apr	16.apr	23.apr	29.okt	06.nov	24.sep	01.okt	01.okt	
<b>Før mediumskift</b>									
Antall enkeltceller	0	8	5	5	8	10	13	15	8,0
Antall kolonier	31	40	25	31	28	21	36	44	32,0
Antall strengkolonier	0	0	4	0	0	0	5	2	1,4
Totalt	31	48	34	36	36	31	54	61	41,4
<b>Etter mediumskift</b>									
Antall enkeltceller	0	5	2	3	2	0	12	6	3,8
Antall kolonier	29	38	23	31	28	20	38	44	31,4
Antall strengkolonier	0	0	5	0	0	0	4	2	1,4
Totalt	29	43	30	34	30	20	54	52	36,5
<b>Bortfall</b>									
Andel enkeltceller		0,375	0,600	0,400	0,750	1,000	0,077	0,600	0,543
Andel kolonier	0,065	0,050	0,080	0,000	0,000	0,048	-0,056	0,000	0,023
Andel strengkolonier							0,200	0,000	0,100
Totalt andel bortfalte enheter	0,065	0,104	0,118	0,056	0,167	0,355	0,000	0,148	0,126
T47D-P	22.jan	06.feb	03.sep	10.sep	17.sep	19.mar	26.mar	Snitt	St.avvik
<b>Før mediumskift</b>									
Antall enkeltceller	6	5	5	9	2	2	4	4,7	0,9
Antall kolonier	23	12	30	25	26	19	22	22,4	2,2
Antall strengkolonier	3	2	6	4	0	0	2	2,4	0,8
Totalt	32	19	41	38	28	21	28	29,6	3,1
<b>Etter mediumskift</b>									
Antall enkeltceller	1	5	5	2	1	0	2	2,3	0,7
Antall kolonier	23	9	31	25	25	18	21	21,7	2,6
Antall strengkolonier	3	2	3	4	0	0	2	2,0	0,6
Totalt	27	16	39	31	26	18	25	26,0	2,9
<b>Bortfall</b>									
Andel enkeltceller	0,833	0,000	0,000	0,778	0,500	1,000	0,500	0,516	0,149
Andel kolonier	0,000	0,250	-0,033	0,000	0,038	0,053	0,045	0,050	0,035
Andel strengkolonier	0,000	0,000	0,500	0,000			0,000	0,100	0,085
Totalt andel bortfalte enheter	0,156	0,158	0,049	0,184	0,071	0,143	0,107	0,124	0,019



T-47D-P		22.jan	06.feb	03.sep	10.sep	17.sep	24.sep		
0.3Gy	<b>Før mediumskift</b>								
	Antall enkeltceller	5	2	7	6	5	8	5,5	0,8
	Antall kolonier	16	13	34	24	35	33	25,8	3,9
	Antall strengkolonier	3	0	2	9	2	1	2,8	1,3
	Totalt	24	15	43	39	42	42	34,2	4,8
	<b>Etter mediumskift</b>								
	Antall enkeltceller	4	2	4	3	1	3	2,8	0,5
	Antall kolonier	16	13	33	24	35	32	25,5	3,8
	Antall strengkolonier	3	0	2	8	2	1	2,7	1,1
	Totalt	23	15	39	37	38	36	31,3	4,1
	<b>Forhold</b>								
	<b>Bortfall</b>	0,200	0,000	0,429	0,500	0,800	0,625	0,426	0,118
	Andel enkeltceller	0,000	0,000	0,029	0,000	0,000	0,030	0,010	0,006
	Andel kolonier	0,000		0,000	0,111	0,000	0,000	0,022	0,020
	Andel strengkolonier	0,042	0,000	0,093	0,051	0,095	0,143	0,071	0,020